

Request Form for Translation

U. S. Serial No. : 09/057,179

PTO 2003-5764

S.T.I.C. Translations Branch

Requester's Name: James GrunPhone No. : 703-308-3980

Fax No. : _____

Office Location: CM1 8007Art Unit/Org. : 1641Group Director: Dell/ChambersIs this for Board of Patent Appeals? NoDate of Request: 9/29/2003Date Needed By: 10/29/2003

(Please do not write ASAP-indicate a specific date)

Equivalent
Searching

Foreign Patents

Phone: 308-0881
 Fax: 308-0989
 Location: Crystal Plaza 3/4
 Room 2C01

SPE Signature Required for RUSH: _____

Document Identification (Select One):

(Note: Please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form)

1. ☒ Patent Document No. 99/20748
 Language Japanese
 Country Code WO
 Publication Date 29 Apr 1999
 No. of Pages _____ (filled by STIC)
 Article Author _____
 Language _____
 Country _____

3. ☐ Other Type of Document _____
 Country _____
 Language _____

Document Delivery (Select Preference): E-mail☒ Delivery to Exmr. Office/Mailbox Date: 10.30.03 (STIC Only)☐ Call for Pick-up Date: _____ (STIC Only)

To assist us in providing the
 most cost effective service,
 please answer these questions:

Will you accept an English
 Language Equivalent?
Yes (Yes/No)

Will you accept an English
 abstract?
No (Yes/No)

Would you like a consultation
 with a translator to review the
 document prior to having a
 complete written translation?
No (Yes/No)

Check here if Machine
 Translation is not acceptable:
 (It is the default for Japanese Patents, '93 and
 onwards with avg. 5 day turnaround after
 receipt)

STIC USE ONLY

Copy/Search

Processor: _____

Date assigned: _____

Date filled: _____

Equivalent found: _____ (Yes/No)

Doc. No.: _____

Country: _____

Remarks: _____

Translation

Date logged in: 9.30.03PTO estimated words: 15,025Number of pages: 34

In-House Translation Available: _____

In-House: _____

Translator: _____

Assigned: _____

Returned: _____

Contractor: F&EName: EPriority: 9.30.03Sent: 10.30.03Returned: 10.30.03



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/06, C12P 21/08, C12N 5/12, G01N 33/577, 33/53</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/20748</p> <p>(43) 国際公開日 1999年4月29日(29.04.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04687</p> <p>(22) 国際出願日 1998年10月16日(16.10.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/283442 1997年10月16日(16.10.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大鵬薬品工業株式会社 (TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒101-0054 東京都千代田区神田錦町1丁目27番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 柚源一郎(SOMA, Gen-ichiro)[JP/JP] 〒158-0084 東京都世田谷区東玉川1-10-21 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: ANTI-URACIL MONOCLONAL ANTIBODY AND HYBRIDOMA PRODUCING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 抗ウラシルモノクローナル抗体及びそれを産生するハイブリドーマ</p> <p>(57) Abstract A monoclonal antibody specifically reacting with uracil; a hybridoma producing the antibody; and a process for preparing the same. Specifically a hybridoma which is obtained by conducting cell fusion between myeloma and an animal-origin antibody-producing cell prepared by using an immunogen comprising a combination of a schlepper with uracil or its derivative and which is characterized by producing a monoclonal antibody specifically reacting with uracil; a monoclonal antibody produced from the hybridoma; and methods for qualitatively and quantitatively assaying uracil with the antibody.</p> <p style="text-align: center;">PTO 2003-5764 S.T.I.C. Translations Branch</p>		

(57)要約

本発明はウラシルに特異的に反応するモノクローナル抗体及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、並びにその調製方法を提供する。本発明は、ウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結合物を免疫源として用いて作成される動物由来の抗体産生細胞とミエローマとを細胞融合させて得られる、ウラシルに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ、該ハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体、該抗体を用いたウラシルの定性、定量法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	MN モンゴル	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MW マラウイ	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CH スイス	IN インド	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	PL ポーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PT ポルトガル	
CY キプロス	KG キルギスタン	RO ルーマニア	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	RU ロシア	
DE ドイツ	KR 韓国	SD スーダン	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SE スウェーデン	
EE エストニア	LC セントルシア		

明 細 書

抗ウラシルモノクローナル抗体及び それを産生するハイブリドーマ

5

技術分野

本発明は、ウラシルに特異的に反応するモノクローナル抗体及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。本発明はさらに該モノクローナル抗体を用いることを特徴とするウラシルの免疫化学的測定法に
10 関する。

本発明のモノクローナル抗体及びそれを用いた免疫化学的測定法によれば、血液や尿などの生体試料中に存在するウラシルを特異的に検出測定することができ、これにより、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼが遺伝的
15 に欠損している者を選別することができる。

該酵素欠損者に対して、フッ化ピリミジン系抗腫瘍剤の投与は禁忌である。従って、本発明は、癌患者に対する抗腫瘍剤治療において安全な治療法を選択するツールとしての意味において特に有用である。

20

背景技術

現在、抗腫瘍剤の一つとして、フルオロウラシルなど

- のフッ化ピリミジン系化合物が利用されている。しかしながら、癌患者の中には、その化合物の分解系代謝に関与する酵素であるジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (dihydropyrimidine dehydrogenase: 以下、D P D と略する。) が遺伝的に欠損している者が存在しており (白人乳ガン患者の約 3%)、該 D P D 欠損患者にフッ化ピリミジン系抗腫瘍剤を投与した場合には、死にいたる副作用がおこることが報告されている (Biochim. Biophys. Acta 633, 400-409 (1980))。
- 10 通常、生体内において、ウラシル又はチミンは、D P D の働きによって、それぞれジヒドロウラシル又はジヒドロチミンに代謝されるが、D P D 欠損患者はそれらが代謝されずに、血液又は尿中に多量のウラシル及びチミン、特にウラシルが多量に排出されることが知られている (Adv. Exp. Med. Biol., 253A, 111-118 (1989))。
- 15 従って、フッ化ピリミジン系抗腫瘍剤を癌患者に投与する前に、血液中又は尿中のウラシル又はチミン、特にウラシルの存在を測定することができれば、予め D P D 欠損癌患者を選別することができ、その結果、抗腫瘍剤
- 20 の投薬量を減量または中止して重篤な副作用の発生を回避することが可能となる。

従来、ウラシルを測定する方法としては、高速液体ク

ロマトグラフィー（H P L C）を用いる方法が知られている（Journal of Chromatography B, 672 (1995), 233-239）。しかし、この方法ではサンプルの調製が煩雑で多大の手間と修練を必要とする。また、多検体を測定する
5 するには非常に長時間を要し、更に測定装置や設備等に高額
の費用を必要とする等の欠点がある。従って、検出感
度が高く、迅速性、簡便性及び経済性を具備した新しい
ウラシル測定法が求められる。

また、本発明の類似技術として、特公平 4 - 2 1 4 7
10 9 号公報にはシュードウリジン（psedouridine）に対す
るモノクローナル抗体を用いた免疫測定法が記載されて
いる。ここで用いられるモノクローナル抗体は、ウラシ
ルに対して 3 0 ~ 4 0 % の反応性を有するが、元来進行
癌患者の尿中に増加するシュードウリジンを腫瘍マーカ
15 - ーとして検出するために開発されたものであり、シュ
ードウリジンに対して 9 5 ~ 9 9 % もの高い反応性を示す。
このため、かかるウラシルとシュードウリジンとの間で
交差反応性を有するモノクローナル抗体を用いては、癌
患者を対象として D P D 欠損者と D P D を欠損していな
20 い正常者とを区別することは不可能である。

従って、特に癌患者において D P D 欠損者と正常者と
を選別するためには、ウラシルの生体内代謝物であるジ

ヒドロウラシル、並びに腫瘍マーカーとして用いられるシュードウリジンに対して交差反応することなく、ウラシルを特異的に検出できる方法が求められる。

- 5 本発明は、ウラシルに特異的に反応するモノクローナル抗体、並びに該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供することを目的とするものである。

本発明はさらに該抗ウラシルモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、簡便、迅速でかつ特異的なウ

- 10 ラシルの免疫化学的測定法を提供することを目的とする。

図面の簡単な説明

- 図 1 は、実施例 1 で得られた本発明のモノクローナル抗体について、ウラシルに対する反応性を間接競合阻害
15 E L I S A 法で調べた結果を示す図である（実施例 2）。
横軸はウラシルの量（ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ）を示し、縦軸は吸収率（%）を示す。

発明の開示

- 20 本発明者は、免疫源としてウラシル若しくはその誘導体にシュレPPER（Schlepper）を結合した抗原を用いて抗体産生細胞を調製し、これから細胞融合技術によって

ハイブリドーマを作成して、該ハイブリドーマから產生されるモノクローナル抗体の特性を調べていたところ、得られたモノクローナル抗体が、シュードウリジン及びジヒドロウラシルに対しては反応せず、ウラシルに対して特異的に反応する性質を有していることを見出した。

かかる知見に基づいて、本発明者は、更なる研究により、該モノクローナル抗体のかかる特性を利用することによって、尿中に排泄されるウラシルを、該サンプルを前処理することなく、免疫化学的測定法によって選択的に、

10 しかも迅速かつ簡便に測定することができることを確認して本発明を完成するに至った。

すなわち、第一に、本発明は、ウラシルに対して特異的に反応するモノクローナル抗体を產生しかつ分泌するハイブリドーマ、並びにその調製方法に関する。

15 具体的には、該ハイブリドーマは、ウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結合物を免疫源として用いて作成される動物由来の抗体産生細胞とミエローマとを細胞融合させて得られるものであって、ウラシルに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生する性質を有

20 するものである。

なお、かかる本発明のハイブリドーマの態様として次のものが挙げられる。

(1) 産生されるモノクローナル抗体が、ウラシルに反応しシュードウリジン及びジヒドロウラシルに反応しない特性を有するものである、上記ハイブリドーマ。

(2) 用いられる抗体産生細胞が、インビトロで動物由来の脾細胞にウラシル若しくはその誘導体とシュレッパーとの結合物を接触させ、免疫化して調製されるものである、上記ハイブリドーマ。

(3) 動物由来の抗体産生細胞が、マウス由来の脾細胞を起源とするものである、上記ハイブリドーマ。

10 (4) シュレッパーに結合するウラシル若しくはその誘導体が、ウラシル；ウラシル-4-酢酸；1-カルボキシメチルウラシル、5-ブロモ-1-カルボキシメチルウラシル又は5-フルオロ-1-カルボキシメチルウラシル等のカルボキシメチル基を有するウラシル誘導体；
15 ウラシル-5-カルボン酸、ウラシル-6-カルボン酸又はウリジン-6-カルボン酸等のカルボキシル基を有するウラシル誘導体；ウリジンジアルデヒド、ウリジン5'-リン酸、ポリウリジン酸、N-カルバミル- β -アラニン、オロチジン5'-リン酸及びウリジン5'-
20 ジホスホグルクロン酸からなる群から選択される少なくとも1種である、上記ハイブリドーマ。

(5) シュレッパーが、スカシガイのヘモシアニン又は

ウシ血清アルブミンである、上記ハイブリドーマ。

- (6) 免疫源として用いるウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結合物が、ウラシルーヘモシアニン複合体、ウラシルーウシ血清アルブミン複合体、1-カルボキシメチルウラシルーヘモシアニン複合体、1-カルボキシメチルウラシルーウシ血清アルブミン複合体、5-ブロモ-1-カルボキシメチルウラシルーヘモシアニン複合体、5-ブロモ-1-カルボキシメチルウラシルーウシ血清アルブミン複合体、ウリジンジアルデヒドーヘモシアニン複合体及びウリジンジアルデヒドーウシ血清アルブミン複合体からなる群から選択される少なくとも1種である、上記ハイブリドーマ。

(7) 用いられるミエローマがマウスから得られる骨髓腫株化細胞である上記ハイブリドーマ。

- (8) 通商産業省工業技術院生命工学技術研究所（日本国）に寄託されているものであって、受託番号がFERM BP-6141である上記ハイブリドーマ。

第二に、本発明は、上記いずれかのハイブリドーマによって産生される、ウラシルに対して特異的に反応するモノクローナル抗体に関する。好適には、ウラシルに反応し、シュードウリジン及びジヒドロウラシルに反応しない特性を有するモノクローナル抗体である。

第三に、本発明は、上記いずれかの抗ウラシルモノクローナル抗体を用いることを特徴とするウラシルの免疫化学的測定法に関する。

かかるウラシルの免疫化学的測定法の具体的な態様として、上記抗ウラシルモノクローナル抗体とウラシルの存在が疑われる被検試料とを接触させ、放射性同位元素免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光抗体法又は凝集反応法のいずれかの方法を用いて、被検試料中のウラシルを検出又は定量することを特徴とする方法；

又は下記：

- (a) ウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結合物からなる抗原を任意の担体に固定化した固相化合物（以下、固相化抗原ともいう。）を含む反応系に、疑ウラシル含有被検試料及び上記モノクローナル抗体を配合する工程、
 - (b) 抗原－抗体複合体を形成させる条件下で、上記反応物をインキュベーションする工程、
 - (c) 固相化抗原－抗体複合体に第二抗体を反応させる工程、及び
 - (d) 第二抗体と結合した固相化抗原－抗体複合体を検出する工程
- を含むウラシルの免疫化学的測定法が挙げられる。

まず、第一の発明である、ウラシルに対して特異的なモノクローナル抗体を合成し分泌する特性を有するハイブリドーマ、並びにその調製法について説明する。

- 5 本発明のハイブリドーマの調製にあたり、免疫源として用いられるウラシル若しくはその誘導体は、特に制限されないが、それ自体では免疫源性が非常に弱いため、適当なシュレPPERに結合させてウラシル（若しくはその誘導体）-シュレPPER複合体として用いられることが望ましい。
- 10

ここでシュレPPERとは、担体のことであり、免疫源性が非常に弱いか、またはハプテン基のように単独では抗体生産能をもたない物質(material)と結合して、免疫源性を増強するか、または発現させる物質をいう。

- 15 シュレPPERとしては、一般には分子量の比較的大きなタンパク質が用いられるが、その他、赤血球などの細胞や、多糖体なども用いられる。シュレPPERの例としては、スカシガイのヘモシアニン（K L H）、卵白アルブミン（O V A）、ウシ血清アルブミン（B S A）、ウ
- 20 サギ血清アルブミンなどが挙げられるが、特にK L H又はB S Aが好ましい。

本発明では、免疫源として、ウラシル-シュレPPER

複合体のウラシルに替えてウラシル誘導体を用いたウラシル誘導体-シュレPPER複合体を用いることもできる。ウラシル誘導体としては、特に制限されないが、通常ウラシル-4-酢酸、1-カルボキシメチルウラシル、5-
5 -ブromo-1-カルボキシメチルウラシル及び5-フルオロ-1-カルボキシメチルウラシル等のように置換基としてカルボキシメチル基を有するウラシル誘導体、ウラシル-5-カルボン酸、ウラシル-6-カルボン酸及びウリジン-6-カルボン酸等のように置換基としてカルボキシ基を有するウラシル誘導体のほか、ウリジン
10 ジアルデヒド、ウリジン5'-リン酸、ポリウリジン酸、N-カルバミル- β -アラニン、オロチジン5'-リン酸、ウリジン5'-ジホスホグルクロン酸等を例示することができる。好適なウラシル誘導体としては、置換基
15 としてカルボキシメチル基を有するウラシル誘導体、置換基としてカルボキシ基を有するウラシル誘導体、ウリジンジアルデヒド及びウリジン5'-リン酸を挙げることができる。より好適には置換基としてカルボキシメチル基を有するウラシル誘導体及びウリジンジアルデヒド
20 を挙げることができる。また特に好適なウラシル誘導体としては、1-カルボキシメチルウラシル、5-ブromo-1-カルボキシメチルウラシル、ウリジンジアルデヒ

ドを挙げることができる。

ウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結合は、特に制限はされないが、例えば、混合酸無水物法 (B.F. Erlanger et al.: J. Biol. Chem. 234 1090-1094 (1954)) または活性化エステル法 (A. E. KARU et al.: J. Agric. Food Chem. 42 301-309 (1994)) 等の公知の方法によって行うことができる。また、簡便な方法として、イムジェクト イムノーゲン EDC コンジュゲーション キット (Immject Immunogen EDC Conjugation Kit、Pierce社製) を用いて、添付のマニュアルに従って結合させる方法を挙げることでもある。

抗体産生細胞は、上記免疫源を常法に従って動物に接種するか又は動物細胞と接触させて、*in vivo*又は*in vitro*で免疫化することによって調製できる。本発明において好適にはインビトロ免疫法 (In Vitro Immunization) が用いられる [Methods Enzymol. (1986), 121 (Immunochem. Tech., Pt. 1), 27-33、J. Immunological Methods (1982), 53, 261-291等]。

かかるインビトロ免疫法として、具体的には、3～100週令の動物から脾臓を取り出して、脾臓から調製した脾細胞をインビトロで、ウラシル (又はその誘導体) -シュレPPER複合体とともにインキュベーションして感

作させる方法を挙げることができる。このとき、細胞の免疫性能を高めるためにロムルチド、ムラミルジペプチド（MDP）等のムラミルジペプチド誘導体、又はリポ多糖等を用いることが好ましい。より好ましくは、ムラミルジペプチド誘導体の使用である。

上記脾臓の由来は特に制限されず、広くマウス、ラット、ウマ、ヤギ又はウサギ等の動物に由来する脾臓を用いることができる。すなわち、本発明で用いる抗体産生細胞の由来細胞は、上記動物の脾細胞の中から、ミエローマとの適合性等を考慮して適宜選択して用いることができる。好ましくは、マウス由来の脾細胞である。

上記抗体産生細胞と融合されるミエローマ細胞としては、特に制限されることなくマウス、ラット、ウマ、ヤギ、ウサギ又はヒト等に由来するものを広く挙げることができる。好適には、用いる抗体産生細胞と同種の動物に由来するものであることが望ましく、例えばマウスに由来するミエローマ細胞を挙げることができる。

例えば、抗体産生細胞がマウスの脾細胞に由来する場合、その融合の相手としては、マウスから得られた骨髓腫株化細胞を用いることが好ましい。具体的には 8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c 由来）骨髓腫細胞株であり、かかるものとしては、例えば P3/X63-

A g 8 (X 6 3) [Nature, 256, 495-497 (1975)]、 P
3 / X 6 3 - A g 8. U 1 (P 3 U 1) [Current Topi
cs. in Microbiology and Immunology, 81 1-7 (1987)]、
P 3 / N S I - 1 - A g 4 - 1 (N S - 1) [Eur. J. Im
5 munol., 6, 511-519 (1976)]、 S p 2 / O - A g 1 4
(S p 2 / O) [Nature 276, 269-270 (1978)]、 F O
[J. Immuno. Meth., 35, 1-21 (1980)]、 M P C - 1 1、
X 6 3 . 6 5 3、 S 1 9 4 等を挙げることができる。好ま
しくは、 P 3 U 1 細胞である。

10 前記抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、
公知の方法、例えば、Nature 256, 495-497 (1975)に記
載の方法、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5122-5126
(1981)に記載の方法又はこれらに準ずる方法によって行
うことができる。

15 より具体的には、細胞融合は、上記抗体産生細胞及び
ミエローマ細胞を、例えば融合促進剤の存在下に通常の
栄養培地中に共存させることによって行われる。融合促
進剤としては、特に制限されることなく通常用いられる
もの、例えばポリエチレングリコール (P E G)、セン
20 ダイウイルス等を使用することができるが〔細胞組織化
学 (山下修二ら、日本組織細胞化学会編；学際企画、1
9 8 6 年) 等〕、好ましくは細胞毒性が比較的少なく、

融合操作が簡単なPEGである。また所望により、融合効率を高めるために、ジメチルスルホキシド(DMSO)等の補助剤を併用することもできる。

また、上記融合促進剤を用いた融合法（例えば、前述
5 するポリエチレングリコール法）に代えて、電気処理による融合方法（電気融合法）を適宜採用することもできる。

抗体産生細胞とミエローマ細胞との使用比率としては、通常の方法と同様の割合を使用することができ、例えば
10 ミエローマ細胞に対して抗体産生細胞を2～10倍程度用いればよい。好ましくは4～7倍程度を挙げることができる。

抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合し、抗体生産能および増殖能を獲得したハイブリドーマ群の選択は、
15 通常の選択用培地を用いる培養によって行うことができる。

ここで選択用培地としては、例えば、ミエローマ細胞株として8-アザグアニン耐性株を使用する場合には、HAT培地を挙げることができる。かかるHAT培地で
20 の培養は、目的とするハイブリドーマ以外の未融合細胞等が死滅するのに十分な期間、通常3～10日間行えばよい。

かくして得られるハイブリドーマは、次いで、通常の方法に従って、目的とする抗ウラシルモノクローナル抗体を産生する株のスクリーニング、クローニングの工程に供される。

- 5 抗ウラシルモノクローナル抗体産生株のスクリーニングは、上記の如くして得られたハイブリドーマ群を含む培養上清の一部をとり、これを試料として、一般に抗体検出に使用されている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社 R & D プラニング発行、第 30 頁～第 53 頁、昭和 57 年 3 月 5 日）、例えば、放射性同位元素免疫測定法（R I A）を用いて、その中に含まれるウラシルを検出、確認することによって行うことができる。なお、抗体検出方法としては、例えば酵素免疫測定法（E L I S A 法）（Engvall, E., Meth.
- 10 Enzymol., 70, 419-439 (1980)）、蛍光抗体法、ブランク法、スポット法、血球凝集反応及びオクタロニー（O u c h t e r l o n y）等を挙げることができるが、感度、迅速性、正確性、安全性、自動化等の観点から、E L I S A 法を利用することが好ましい。
- 15 抗ウラシルモノクローナル抗体産生株のスクリーニングは、より具体的には、例えば、間接競合阻害 E L I S A 法により、以下のような手順により行うことができる。
- 20

(a) 抗原としてウラシル（又はその誘導体）－シュレPPER複合体を担体に吸着させ、固相化する。

(b) 抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係なタンパク質によりブロッキングする。

- 5 (c) この中にウラシルを含む試料とハイブリドーマ培養上清液を加え、ハイブリドーマ培養上清液に含まれるモノクローナル抗体を固相化抗原及び遊離ウラシルと競合的に結合させて、固相化抗原－抗体複合体及び遊離ウラシル－抗体複合体を生成させる。
- 10 (d) 遊離ウラシル－抗体複合体を洗浄除去して、固相化抗原－抗体複合体に酵素で標識化された第二抗体を反応させる。
- (e) 該酵素に対して適当な基質を用いて酵素反応させ、吸光度を測定する。

- 15 なお、上記(a)工程において、固相化抗原として用いられるウラシル（又はその誘導体）－シュレPPER複合体としては、前述する各種の免疫源を利用することができる。

- 尚、固相化抗原として、基本的には抗体産生細胞の調
- 20 製に用いた免疫源と同一物を用いるのが好ましい。しかし、ウラシル又はウラシル誘導体と結合してなるシュレPPERは、固相化抗原と免疫源とで必ずしも同一でなく

てもよく、例えばウラシルーB S A複合体を免疫源として用いる一方で、ウラシルーK L Hを固相化抗原に用いることも可能である。

- 抗原を固相化する担体としては、特に制限されず、E
- 5 L I S A法において常用されるものをいずれも使用することができる。例えば、ポリスチレン又はポリビニール製のマイクロプレート又はビーズが挙げられるが、96穴マイクロプレートを用いるのが好ましい。抗原の濃度は特に制限されず広い範囲から適宜選択できるが、通常
- 10 0.01 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度、好ましくは0.05 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲が適している。また、その容量は、担体として96穴マイクロプレートを使用する場合にはウエルの底面を覆うのに十分な量であればよく、通常1ウエルあたり20 ~ 150 μl 程度が望ましい。
- 15 吸着条件は、特に制限はないが、通常4 ~ 40℃程度で1時間 ~ 一晚程度静置する方法が適しており、好ましくは37℃程度で2時間程度の静置である。

- (b) 工程において、ブロッキングに使用されるタンパクとしては、例えば、子牛血清、卵白アルブミン、ウ
- 20 シ血清アルブミン、ウシ胎児血清(FCS)等が使用でき、好ましくは子牛血清である。ブロッキングの条件は、特に制限はないが、通常4 ~ 40℃程度で1時間 ~ 一晚

程度静置する方法が適しており、好ましくは37℃程度で2時間程度の静置である。ブロッキング後、マイクロプレートを緩衝液で洗浄する。ここで用いられる緩衝液としては、特に制限はされないが、例えば、T w e e n 5 20を含むリン酸塩緩衝液(PBS)(pH7.3~7.7)が適している。

(c) 工程において、具体的条件としては特に制限はないが、通常室温~40℃程度で0.5~3時間程度静置する方法が適しており、好ましくは37℃程度で1時間程度である。反応後、マイクロプレートを緩衝液で洗浄する。ここで用いられる緩衝液としては、特に制限はされないが、例えば、T w e e n 20を含むPBS(pH7.3~7.7)が適している。

(d) 工程において、第二抗体としては、例えばアルカリホスファターゼ(AP)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、 β -ガラクトシダーゼ(β -GS)、グルコースオキシダーゼ(GO)、ウレアーゼなどの酵素で標識した酵素標識抗マウス免疫グロブリン抗体が使用できる。好ましくは、AP標識抗マウス免疫グロブリン抗体である。第二抗体は通常希釈して使用されるが、ウラシル-シュレPPER複合体を介してマイクロプレートに結合したモノクローナル抗体(第一抗体)に対して

約100～10,000倍、好ましくは約200～500倍となるように希釈した第二抗体を用いることが望ましい。その希釈には例えば1%ウシ血清アルブミンを含むPBS (pH 7.3～7.7)を用いることが望ましい。

- 5 反応は、特に制限されないが通常約37℃で約1時間程度行なわれ、反応後、緩衝液で洗浄する。

以上の反応により、第二抗体が、固相化抗原を介してマイクロプレートに結合したモノクローナル抗体に結合する。

- 10 (e) 工程において、結合した第二抗体の酵素と基質との反応によって、基質を発色させるか又は該反応系に更に発色試薬を加えて、吸光度の変化を測定する。より具体的には、例えば、第二抗体に結合させる標識酵素としてアルカリホスファターゼを使用する場合には、p-
- 15 ニトロフェニルリン酸を基質として用いて酵素反応によって発色させ、2NのNaOHを加えて酵素反応を止め、415nmでの吸光度を測定する方法が適している。一方、第二抗体に結合させる標識酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、基質として過酸化水素、発色
- 20 試薬としてo-フェニレンジアミンを使用することが望ましい。この場合、特に制限されないが、通常、発色試薬溶液を加え約25℃で約10分間反応させた後、4N

の硫酸を加えることにより酵素反応を停止させる方法が
用いられる。発色試薬として α -フェニレンジアミンを
使用する場合、492 nmにおける吸光度を測定する。

なお、ここで、アビジン-ビオチンシステムによる増感

5 法を利用することもできる。

次いで、以上述べたスクリーニングによりウラシルに
特異的なモノクローナル抗体を産生することが判明した
ハイブリドーマについて、クローニングを行う。

クローニング法としては、限界希釈により1ウェルに
10 1個のハイブリドーマが含まれるように希釈する方法、
軟寒天培地上に撒きコロニーをとる方法、マイクロマニ
ピュレーターによって1個の細胞を取り出す方法、セル
ソーターによって1個の細胞を分離する「ソータークロ
ーン」法等が挙げられる。簡単であることから限界希釈
15 法が好適に用いられる。

抗体価の認められたハイブリドーマを含むウェルにつ
いて、例えば限界希釈法によりクローニングを1～4回
繰り返して、安定して抗体価が認められたものを、抗ウ
ラシルモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として
20 選択する。

上記方法によって取得される本発明のハイブリドーマ
は、例えば10%のウシ胎児血清(FCS)を含有する

RPMI 1640 培地中に、例えば 5×10^6 細胞 / ml 以上において、必要に応じて凍結安定化剤として 10% ジメチルスルホキシドを用いて、凍結することによって -80℃ 以下、例えば液体窒素中に -195℃ で保存することができる。

本発明のハイブリドーマは、後述するように RPMI 1640、DMEM、MEM 等の基本培地中での培養において安定であり、ウラシルに対して特異的反応性を有するモノクローナル抗体を産生、分泌する。更に、これらの細胞系は液体窒素中に安定に貯蔵し、それから容易に回収することができる。すなわち、本発明のハイブリドーマは、ウラシル抗原に対して反応する純粋なモノクローナル抗体の、入手容易な供給物として有用である。

なお、かかるハイブリドーマは、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号に住所を有する通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に、1997 年 10 月 14 日に微生物の表示（寄託者が付した識別のための表示）「Mouse hybridoma SU-1」、（受託番号）「FERM BP-6141」として寄託されている。

20

次に、第二の発明であるウラシルに特異的に反応するモノクローナル抗体について説明する。

当該モノクローナル抗体は、上記方法によって得られる本発明のハイブリドーマにより産生されるものである。

かかるモノクローナル抗体は、上記ハイブリドーマを培養することによって調製することができる。

- 5 ハイブリドーマを培養する培地としては、例えば、RPMI 1640、DMEM、IMEM等を基本培地として挙げるることができる。好ましくはRPMI 1640である。また、該培地に細胞増殖・分化を促進させるためにウシ胎児血清、ヒトトランスフェリン等を添加し、細胞増殖の促進のために10% BM conditioned
- 10 H1（登録商標、ベーリンガー・マンハイム社製）及び／又はエネルギー源の補給のためにL-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム等を添加することが可能である。

- ハイブリドーマの培養は、例えばCO₂濃度4～6%程度及び36～38℃で培養するが好ましい。大量培養は
- 15 大型培養ビンを用いた回転培養等によって行われる。

- この培養上清液をそのまま抗ウラシルモノクローナル抗体ソースとして使用することもできるが、さらに透析、硫酸アンモニウムによる塩析、ゲル濾過、凍結乾燥等を行
- 20 い、イムノグロブリン画分を集め、また所望により更に該画分を精製することによって抗ウラシルモノクローナル抗体を得ることができる。

上記する画分の精製方法としては、特に制限されないが、D E A E -セファロースカラム等を利用するイオン交換クロマトグラフィー、プロテインA -セファロースカラムを利用するアフィニティークロマトグラフィー等を含む高速液体クロマトグラフィー（H P L C）などの慣用方法を使用することができる。

上述の操作により得られる本発明の抗ウラシルモノクローナル抗体は、上述する間接競合阻害E L I S A法等を利用して、その交差反応性を評価することができる。

10 該評価は、具体的には上記E L I S A法において競合反応の際にウラシルに代えて交差反応を調べる化合物をウェルに添加することによって行うことができる。

かかる交差反応性の評価によって、実施例で述べるように、本発明の抗ウラシルモノクローナル抗体は、ウラシルに反応するものの、シュードウリジン及びジヒドロウラシルに対してはほとんど交差反応せず、ウラシルに対して特異性を有していることが判明した。

15

このように本発明のモノクローナル抗体は、ウラシルに対して高い反応性を有しており、さらにそれは本発明のハイブリドーマを培養することによって均一かつ大量に供給できるため、ウラシルを免疫化学的に特異的に検出測定するための試薬として有用である。また当該モノ

20

クローナル抗体は、ウラシルの精製にも用いることができる。

特に本発明のモノクローナル抗体が有する反応特異性は、癌患者の尿中に夾雑物質として存在し得るシュード
5 ウリジン及びジヒドロウラシルに対して反応しないというものであるため、本発明のモノクローナル抗体は、特に癌患者を対象として、D P Dの欠損に起因してウラシルを尿中に排泄するD P D欠損者とD P Dを欠損していない正常者とを選別するのに有用である。

10

従って、本発明の第三は、上記本発明の抗ウラシルモノクローナル抗体を用いることを特徴とするウラシルの免疫化学的測定法である。

免疫化学的測定法は、抗体が抗原を特異的に認識する
15 ことに起因する抗原-抗体反応に基づいて、被験試料中に含まれる抗原を検出測定する方法であり、精度、簡便性、迅速性、経済性において優れているため、生化学的試験や臨床診断等の分野で広く採用されている。

免疫化学的測定法としては、公知の方法を広く挙げる
20 ことができ、具体的には前述するように、例えばR I A法、酵素免疫測定法（E L I S A法）、蛍光抗体法、血液凝集反応法等を例示することができる。好適には、E

L I S A法であり、その有用性については〔Tijssen P,
"Practice and theory of enzyme immunoassays" in L
aboratory techniques in biochemistry and molecular
biology, Elsevier Amsterdam New York, Oxford ISBN
5 0-7204-4200-1 (1990)〕に詳細に記述されている。

なお、各免疫化学的測定法における操作、手順は、第一抗体として本発明の抗ウラシルモノクローナル抗体を使用する以外は、基本的に常法に従って行うことができる。

- 10 本発明の免疫化学的測定法は、ウラシルの存在が疑われる被検試料を対象として、それに含まれるウラシルを特異的に検出若しくは測定（定量）するものであれば、その具体的な目的及び適用対象等を問うものではない。例えばジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ（D P D）
- 15 欠損者をそれを欠損しない正常者と識別する等といった臨床診断を目的とする場合は、被検試料として尿、血清、血漿等の体液が用いられる。

尿等の生体被検試料は、そのまま本発明の免疫化学的測定法に供することもできるが、予めイオン交換樹脂等で処理しておくこともできる。

20

本発明の免疫化学的測定法として、好適には、被験者の生体試料を本発明の抗ウラシルモノクローナル抗体と

ともに、抗原－抗体複合体を形成する条件下でインキュベーションする工程、及び形成された抗原－抗体複合体を検出する工程を基本的に包含する測定法を挙げることができる。かかる免疫化学的測定法の設計は、直接法、
5 間接法、競合法、サンドイッチ法等といった本発明の技術分野で通常行われている多くの改変を伴うことができる。

より具体的には、ヒト尿サンプルを被験試料とする固相化E L I S A法を例にすると、ウラシルの検出測定法
10 は例えば次の方法で行うことができる。

まず、本発明の抗ウラシルモノクローナル抗体を任意の担体に固相化しておき、抗原と無関係な蛋白質により、該抗体で覆われていない固相表面を覆う。該表面を洗浄後、被験試料としての尿サンプルと酵素標識抗原、例え
15 ば酵素で標識されたウラシル（又はその誘導体）－シュレPPER複合体を加え、競合反応させる。これに酵素基質を加え、被験試料の添加による吸光度の減少を測定する。具体的には、被験試料の添加による吸光度の減少の有無を測定することにより尿サンプル中のウラシルの存
20 在の有無が判定でき、また被験試料の添加による吸光度の減少の程度を測定することによって、予め既知量のウラシルを用いて作成した標準線から、尿サンプル中のウ

ラシルの量を定量することができる。

また、すでに述べた間接競合阻害 E L I S A 法において、ウラシルを含む試料の代わりに尿サンプルを、またハイブリドーマ培養上清液の代わりに本発明の抗ウラシルモノクローナル抗体を用いる方法を用いることもできる。かかる間接競合阻害 E L I S A 法によれば、本発明のモノクローナル抗体は、被験試料中のウラシルの量を、
5 1 0 0 ~ 1 0 0 0 μ g / m l の範囲で測定できる。

上記免疫化学的測定法を実施するに際しては、本発明
10 の抗ウラシルモノクローナル抗体を含有する試薬キットを利用することが簡便である。

従って、本発明は、上記本発明の抗ウラシルモノクローナル抗体を含むウラシルの免疫化学的測定用の試薬キットに関連するものでもある。

15 具体的には、被検試料中のウラシルを検出又は定量するために用いられる試薬キットであって、上記いずれかのモノクローナル抗体を少なくとも含むことを特徴とするウラシルの免疫化学的測定用試薬キット、または上記いずれかの抗ウラシルモノクローナル抗体に加えて更に
20 ウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結合物を含むことを特徴とするウラシルの免疫化学的測定用試薬キットである。なお、ここで被検試料としては尿サン

プルが好適に用いられる。

- 本発明の試薬キットは、抗ウラシルモノクローナル抗体を有効成分として含むことを特徴とするものであるが、当該有効成分に加えて、固相担体、標識剤、標識剤に応じた基質（検出用試薬）、抗原、二次抗体（例えば抗マウスイムノグロブリンなど）の中から選択される少なくとも一乃至五を組み合わせたもののセットであってもよい。なお、ここで抗原として、好適にはウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの複合体が挙げられる。
- 5 また固相担体、標識剤、標識剤に応じた基質（検出用試薬）、二次抗体としては、前述するものを用いることができる。
- 10

- セット中に標識剤が含まれる場合は、該標識剤は予め二次抗体等の任意成分にコンジュゲートされていてもよい。なお、標識剤としては放射性同位元素、酵素、蛍光物質などの種々の化合物が挙げられるが、操作性等の種々の観点から酵素が好ましい。
- 15

- さらに、当該試薬キットには、測定の実施の便宜のために、適当な抗体若しくは抗原の希釈液、反応希釈液、緩衝液、洗浄剤、基質溶解剤、反応停止液、固相吸着抑制剤等が含まれていてもよい。
- 20

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の説明のために実施例を記載するが、当該実施例はなんら本発明の技術的範囲を制限するものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらはいずれも本発明の技術的範囲に含まれる。

実施例 1

10 1 : 免疫源の調製

イムジェクト イムノーゲン EDC コンジュゲーション キット (Immject Immunogen EDC Conjugation Kit、Pierce社製) を用い、添付のマニュアルに従って、ウラシルにウシ血清アルブミン (BSA) またはスカシ
15 ガイのヘモシアニン (KLH) を結合させ、ウラシルー BSA 複合体又はウラシルー KLH 複合体を調製した。
具体的には、次の方法によって調製した。

(A) ウラシルー BSA 複合体の作製

1) キットに添付されている BSA を注射用水 (大塚
20 製薬工場社製) 200 μ l に溶解した。

2) ウラシル 2 mg をキットに添付されている緩衝液 (500 μ l) に溶解させた。

3) 1) の溶液に 2) の溶液を加えた。

4) 3) の溶液をキットに添付の 1-エチル-3-(3-ジメチル-アミノプロピル) カルボジイミド (EDC) 10 mg に加えた。

5) 4) の溶液を室温で 2 時間放置後、10,000 rpm で、5 分間遠心し、沈殿物を除いた。

6) 5) で得られた溶液をキットに添付されている D-ソルト デキストラン脱塩化カラム (D-salt Dextran Desalting Column) に添加し、溶出液を 0.5 ml / tube で分画した。それぞれの画分の 280 nm および 260 nm における吸収を測定し、最初のピーク画分を集め、ウラシル-BSA 複合体溶液とした。

7) 得られた複合体について、蛋白質分解酵素で分解し、その分解物を HPLC を用いて分析することにより複合体の組成を求めた。その結果、BSA : ウラシル (モル比) = 1 : 0.16 ~ 0.72 であることが確認された。

(B) ウラシル-KLH 複合体の作製

1) キットに添付されている KLH を注射用水 (大塚製薬工場社製) 200 μ l に溶解した。

2) ウラシル 2 mg をキットに添付されている緩衝液 (500 μ l) に溶解させた。

3) 1) の溶液に 2) の溶液を加えた。

4) EDC 10 mg を注射用水 1 ml に溶解させ、その溶液の 50 μ l を 3) の溶液に加えた。

5) 4) の溶液を室温で 2 時間放置後、10,000 rpm で、5 分間遠心し、沈殿物を除いた。

6) 5) で得られた溶液をキットに添付されている D-ソルト デキストラン脱塩化カラム (D-salt Dextran Desalting Column) に添加し、溶出液を 0.5 ml / tube で分画した。それぞれの画分の 280 nm および 260 nm における吸収を測定し、最初のピーク画分を集め、ウラシル-K L H 複合体溶液とした。

7) 得られた複合体について、蛋白質分解酵素で分解し、その分解物を HPLC を用いて分析することにより複合体の組成を求めた。その結果、K L H : ウラシル (モル比) = 1 : 2 であることが確認された。

2 : インビトロ免疫法による免疫細胞 (抗体産生細胞) の作製

(A) 脾細胞の調製

BALB / c マウス 2 匹から脾臓を摘出し、直径 6 cm のプラスチックシャーレに入れた。このプラスチックシャーレに RPMI 1640 培地を 5 ml 注ぎ入れ、摘

- 出した脾臓を洗った。別に5 mlのRPMI 1640培地を入れた直径6 cmのプラスチックシャーレを2枚用意し、この中でさらに2回洗った。以上の洗浄操作をさらにクリーンベンチ内で同様に繰り返した。最後に移したシャーレの中で脾臓をつぶし、脾細胞をRPMI 1640培地中に懸濁させた。この細胞懸濁液を15 mlの遠心管に移し、1000 rpm、室温で7分間遠心し、上清を取り除いた。沈殿した細胞をRPMI 1640培地10 mlに懸濁させ、そのまま3分間室温で静置した。
- 5 遠心管の底に沈んだ組織片を吸い取らないように細胞懸濁液を50 mlの遠心管に移した。以上の操作で調製した細胞を次のインビトロ免疫法に用いた。

(B) インビトロ免疫法

- (A)で調製した脾細胞の細胞数を血算板を用いて算定し、生細胞で 1×10^7 細胞/mlになるよう、RPMI 1640培地で希釈した。この細胞懸濁液を6ウェル平底プレートに2.5 ml/ウェルで播いた。そこに250 μ g/mlのノピア（登録商標、一般名：ロムルチド、第一製薬製）を100 μ l/ウェルで加え混和し、上記
- 15 1 : (B)で得られ、系列希釈したウラシル-K L H複合体溶液を100 μ l/ウェル加え混和した後、このプレートを37℃、5% CO₂下で15分間静置した。

なお、系列希釈は、 2500 ng/ml 、 500 ng/ml 、 100 ng/ml 、 20 ng/ml 、 4 ng/ml となるように行った。

その後、40%牛胎児血清 (FBS) を含む RPMI 1640 培地を2.5 ml/ウェル加え、混和し、37℃、5% CO₂ 下で5日間培養し、感作B細胞 (抗体産生細胞) を得た。

3 : 細胞融合

10 (A) ミエローマ細胞の調製

ミエローマとして8-ダザグアニン耐性マウス (BALB/C由来) 骨髓腫細胞株化細胞であるP3U1細胞を用いた。P3U1細胞は予め10% FBSを含む RPMI 1640 培地で2日おきに継代培養しておいた。

15 継代培養1日目のP3U1細胞を50 ml 遠心管に移し、1000 rpm、4℃で5分間遠心した。上清液を取り除き、沈殿したP3U1細胞を10 ml の RPMI 1640 培地に懸濁した。かかる操作で調製したミエローマ (P3U1細胞) を細胞融合に用いた。

20 (B) 感作B細胞 (抗体産生細胞) の調製

上記2 : (B) で5日間培養し、免疫した脾細胞 (抗体産生細胞) をピペットで懸濁し、プレートに付着してい

ない脾細胞を50 mlの遠心管にひとまとめにして回収した。これを1000 rpm、4℃で7分間遠心した。上清液を取り除き、沈殿した細胞を10 mlのRPMI 1640培地に懸濁した。以上の操作で調製した感作細胞群を次の細胞融合に用いた。

(C) 細胞融合

(A)で調製したP3U1細胞と(B)で調製した感作細胞群の細胞数を数え、P3U1細胞(細胞数) : 感作細胞群(細胞数) = 1 : 5の割合で混和し、室温にて15分間静置した。その後、1000 rpm、室温で遠心し(7分間)、上清を除去した。遠心管をたたいて沈殿した細胞をほぐした。ほぐれた細胞の入った遠心管を回転させながら、10秒間、総細胞数 2×10^8 個あたり1 ml容量の50%ポリエチレングリコール(平均分子量1000)を添加し、そのまま50秒間回転を続けた。引き続き遠心管を回転させながら、15 mlのRPMI 1640培地を3分間で添加し、さらに25 mlのRPMI 1640培地を1分間で添加した。遠心管のスクリーキャップを閉じ、上下に2~3回転倒させ、内容液を均一にし、1000 rpm、室温で7分間遠心した。上清を取り除き、沈殿を10%牛胎児血清を含むHAT培地に懸濁させた(感作細胞として 1.6×10^6 個/ml

とした)。この細胞懸濁液を $200 \sim 250 \mu\text{l}$ ／ウェルとなるように96穴平底プレートにまいた。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で静置しながら、12日間培養した。

5 4 : ハイブリドーマの選択

3 : で得られたハイブリドーマ細胞について、以下の操作を行った。

(A) ELISAによるスクリーニング

96穴イムノプレートに1 : (A)で得られたウラシル
10 - BSA複合体 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ (BSA換算)を $50 \mu\text{l}$
1 /ウェル入れ、 37°C で2時間放置した。放置後、 0.05% ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (和光純薬工業製、Tween 20相当品)を含む
PBS (pH 7.3 ~ 7.7、日水製薬製；以下、PB
15 S-Tと称する。) で7回洗浄した後、 60% 子牛血清
 $200 \mu\text{l}$ を入れ、 37°C で2時間放置した。

その後PBS-Tで7回洗浄後、ウェルに、

(i) 3 : で得られたハイブリドーマ培養上清液 $30 \mu\text{l}$
とPBS $3 \mu\text{l}$ とを混合し、 37°C で1時間反応させた
20 液、

(ii) 予めハイブリドーマ培養上清液 $30 \mu\text{l}$ と $1 \text{mg} / \text{ml}$ になるようにPBSに溶解させたウラシル溶液

30 μ l とを混合し、37℃で1時間反応させた液、
または

- (iii) 1 μ g / ml 正常マウス IgG (Biological社製) を、
それぞれ 50 μ l / ウェルの割合で入れ、37℃、1時
5 間放置した。次いで該ウェルをPBS-Tで7回洗浄し、
1% BSAで300倍希釈したアルカリフォスファター
ゼ (AP) 標識抗マウス多価免疫グロブリン抗体 (Si
gma社製) を 50 μ l / ウェル入れ、37℃で1時間
放置した。その後、PBS-Tで7回洗浄後、1mg /
10 ml になるように p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウ
ム (和光純薬工業社製) を基質緩衝液に溶解した溶液を
100 μ l / ウェル入れ、37℃で30分放置した後、
2N NaOH 50 μ l / ウェル入れてプレートミキサ
ーで混合して反応を停止させ、マイクロプレートリーダ
15 ーにて 415 nm の吸光度を測定した。

なお、吸収率は、以下の式により計算した。

$$\text{吸収率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{uracil}} - \text{OD}_{\text{control}}}{\text{OD}_{\text{PBS}} - \text{OD}_{\text{control}}} \right) \times 100$$

20

- (i) OD_{PBS} : ハイブリドーマ培養上清をPBSのみで
前処理した時のELISAの吸光度

(ii) O D uracil : ハイブリドーマ培養上清をウラシル
で前処理した時のELISAの吸光度

(iii) O D control : 正常マウスIgGのみで処理した時の
ELISAの吸光度

5

上記測定により、測定感度の高いものを選別した。

(B) 上記スクリーニングによる選別の結果、5種のモノ
クローナル抗体産生細胞(3C10、1C4、4E3、
3D5、1C5)が得られた。そのうちの1つである4
10 E3を「Mouse hybridoma SU-1」
として、ブタペスト条約に基づき、通商産業省工業技術
院微生物工業技術研究所に寄託した(受託番号: 微工研
条寄第6141号(FERM BP-6141))。

15 5 : クローニング

上記で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを公知慣用の限界希釈法を用いて、クローニングした。

具体的には、4 : で得られたモノクローナル抗体産生
ハイブリドーマの細胞数を数え、0.8個/0.25m
20 l / ウェルで10% FBS 及び10% BM cond i
med H1 (登録商標、ベーリンガーマンハイム社製)
を含むRPMI 1640培地を用いてまき込み、CO₂濃

度 5 %、37℃で10～14日間培養した。

得られたクローンを4 : (A)に記載する方法と同様の
ELISA法を用いて選別を行った。その結果、数個の
モノクローナル抗体産生ハイブリドーマがウラシルに特
5 異的な抗体を産生する細胞としてクローン化された。

6 : 抗ウラシルモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ の保存

得られたハイブリドーマを、10% FBS及び10%
10 DMSOを含むRPMI 1640培地において 1×10^7
細胞/mlとなるように調製し、クライオチューブ（ヌ
ンク社製）に1mlずつ分注した。これを-90℃のデ
ィープフリーザーで凍結後、液体窒素中に保存した。

15 実施例 2 モノクローナル抗体の調製及びその評価

実施例 1 の 4 : で得られたモノクローナル抗体産生ハ
イブリドーマ「Mouse hybridoma SU
- 1」の細胞数を数え、0.8個/0.25ml/ウェ
ルで10% FBS及び10% BM conditioned
20 H1（ベーリンガー社製）を含むRPMI 1640培地
を用いてまき込み、CO₂濃度5%、37℃で10～14
日間培養した。

得られたハイブリドーマ培養上清液を用いて、実施例 1 の 4 : (A) に記載した間接競合阻害 E L I S A 法に準じて、本発明のモノクローナル抗体 S U - 1 の反応性を調べた。

- 5 具体的には、ウラシル - B S A 複合体 ($10 \mu\text{g/ml}$) を $50 \mu\text{l}$ づつ 96 穴イムノプレート (イムノプレート I、N u n c 社製) に分注し、 37°C で 2 時間放置した後、 0.1% の T w e e n 20 を含有した P B S - T を $200 \mu\text{l}$ / ウェル用いて、合計 7 回洗浄した。次いで、
- 10 ブロッキングとして、上記ウェルに 3% B S A 含有 P B S を $200 \mu\text{l}$ / ウェル添加し、 4°C で終夜静置した後、P B S - T を用いて 3 回洗浄して、プレートを調製した。

- 一方、(i) $30 \mu\text{l}$ のハイブリドーマ培養上清に P B S を $30 \mu\text{l}$ 加えたもの、(ii) $30 \mu\text{l}$ のハイブリドーマ
- 15 培養上清にウラシル ($30 - 1000 \mu\text{g/ml}$) を含有する P B S を $30 \mu\text{l}$ 加えて 37°C で 1 時間放置したもの、または (iii) $1 \mu\text{l/ml}$ の正常マウス I g G (B i o l o g i c a l s 社製) を、それぞれ $50 \mu\text{l}$ / ウェルの割合で上記の
- 20 抗原を吸着させた 96 穴プレートに添加し、 37°C 1 時間放置した。次に、これを P B S - T で 7 回洗浄し、 1% B S A 含有 P B S で 1000 倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗マウス抗体 (二次抗体、Sigma 社製)

50 μ l/ウェルを添加し、37℃で1時間放置した。次にPBS-Tで7回洗浄し、酵素基質溶液(1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate、pH 9.8)を100 μ l/ウェル加え、37℃で30分間放置した。次いで、2 N NaOHを50 μ l/ウェル加え、反応を停止させ、プレートリーダーで415 nmの吸光度を測定した。

なお、吸収率は前述の式により求めた。

結果を図1に示す。図からわかるように、ウラシルの量を100～1000 μ g/mlの範囲で検出できることが分かった。

実施例3 交差反応性試験

実施例2と同様にして、他のウラシル系化合物と本発明のモノクローナル抗体(SU-1)との反応性を調べた。具体的には、実施例2において、ウラシルとの阻害を調べるために行った(ii)の工程で、ウラシル(1 mg/ml)の代わりに、シュードウリジン、ジヒドロウラシル、チミン、シトシン(1 mg/ml)をそれぞれ用いて、同様にして実験を行って、ウラシル系化合物と本発明のモノクローナル抗体(SU-1)との反応性を調べた。結果を表1に示す。

<表 1>

ウラシル系化合物に対する交差反応性

ウラシル系化合物	モノクローナル抗体 S U - 1 *
ウラシル	1 0 0
シュードウリジン	- 1 5
ジヒドロウラシル	- 1 9
チミン	4 6
シトシン	- 2 8

* 1 mg/ml の各ウラシル系化合物の吸収率について、
ウラシルを100%とした場合の相対値を示す。

この結果から分かるように、本発明のモノクローナル抗体は、ウラシルに対し特異的に反応し、シュードウリジン及びジヒドロウラシルに対しては全く反応性を示さなかった。

実施例 4 免疫源としてウラシル誘導体-シュレッパ-複合体の使用-1

1: 免疫源 (1-カルボキシメチルウラシル-シュレッパ-複合体) の調製

実施例 1 と同様にして、イムジェクト イムノーゲン
EDC コンジュゲーション キット (Immject Immu

nogen EDC Conjugation Kit、Pierce社製）を用い、添付のマニュアルに従って、1-カルボキシメチルウラシルにウシ血清アルブミン（BSA）またはスカシガイのヘモシアニン（KLH）を結合させ、1-カルボキシメチルウ
5 ラシル-BSA複合体又は1-カルボキシメチルウラシル-KLH複合体を調製した。具体的には、次の方法によって調製した。

1) 1-カルボキシメチルウラシル 6 mg を、1.5 ml 容量の conjugation buffer (0.1 M MES (2-(N
10 -Morpholino)-ethane sulfonic acid)、0.15 M NaCl、pH 4.7) に溶解した。

2) BSA 又は KLH 10 mg を 1 ml の conjugation buffer に溶解した。

3) 2) で調製した BSA 又は KLH 溶液 200 μ l
15 に、1) の 1-カルボキシメチルウラシル溶液 50 μ l 及び 1-エチル-3-(3-ジメチル-アミノプロピル)カルボジイミド (EDC) 125 μ l (KLH の場合は 50 μ l) を加えた。

4) 3) の溶液を 37℃ で 2 時間放置後、10,000
20 rpm で、5 分間遠心し、沈殿物を除いた。

5) 4) で得られた溶液をゲル濾過カラム (Sephadex G25) にかけて、未反応の 1-カルボキシメチルウラシ

ルと低分子物質を除去した。

6) 5) で得られた溶液をD-ソルト デキストラン
脱塩化カラム (D-salt Dextran Desalting Column) に添
加し、溶出液を0.5 ml / tube で分画した。それ
5 ぞれの画分の280 nmおよび260 nmにおける吸収
を測定し、最初のピーク画分を集め、1-カルボキシメ
チルウラシル-BSA (またはKLH) 複合体溶液とし
た。

7) 複合体の確認は、1-カルボキシメチルウラシル
10 のピリミジン骨格構造に由来するOD 270nmの吸光度を分
析することにより行った。その結果、BSA又はKLH
1分子あたりにそれぞれ4.98個又は22.9個の1
-カルボキシメチルウラシルが結合したと推定された。

15 2: インビトロ免疫法による免疫細胞 (抗体産生細胞) の作製

(A) 脾細胞の調製

実施例1の2: に記載する方法に従って、BALB /
c マウスから無菌的に脾臓を摘出し、脾細胞を単離して
20 1×10^7 細胞 / ml (血清非含有 RPMI 1640 培地、
日水製薬製) の濃度に調製し、この細胞懸濁液を6ウェ
ル平底プレートに2.5 ml / ウェルで播いた。そこに

最終濃度 $25 \mu\text{g}/\text{ウェル}$ になるように RPMI 1640 培地で希釈した MDP $100 \mu\text{l}$ ($250 \mu\text{g}/\text{ml}$) 及び 1-カルボキシメチルウラシル-BSA 複合体 (系列希釈終濃度 $20 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $500 \text{ ng}/\text{ml}$) を加えた。このプレートを 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 下で 15 分間静置した後、 40% 牛胎児血清 (FBS) を含む RPMI 1640 培地を $2.5 \text{ ml}/\text{ウェル}$ 加え、混和し、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 下で 4~5 日間培養し、感作 B 細胞 (抗体産生細胞) を得た。

10

3 : 細胞融合

細胞融合に用いるミエローマとして実施例 1 と同様に P3U1 細胞を、また感作 B 細胞 (抗体産生細胞) として上記の感作 B 細胞を更に実施例 1 の 3 : に従って調製した感作細胞群を用いた。

細胞融合は、実施例 1 と同様にポリエチレングリコール法を用いて行った。具体的には、P3U1 細胞と感作細胞群とを細胞数が 1 : 5 の割合になるように混和し、 50% ポリエチレングリコール (平均分子量 1000) を添加し、穏やかに混ぜた。次いで、RPMI 1640 培地に分散させ、遠心分離 (1000 rpm 、室温、7 分間) して細胞を沈殿させて上清を取り除いた。これを

20.

10% FBS 含有 HAT 培地で希釈し（感作細胞として 1.6×10^6 個 / ml）、この細胞懸濁液を $250 \mu\text{l}$ / ウェルとなるように 96 穴平底プレートにまき、 37°C 、5% CO_2 下で静置培養した。

5

4：ハイブリドーマの選択

上記の静置培養に用いた HAT 培地では細胞融合したハイブリドーマのみが増殖しコロニーを形成する。これを利用して、上記静置培養の 10～14 日後に得られた

10 ハイブリドーマについて、その培養上清中に目的の性質を有する抗体が産生されているか否かを、免疫抗原を用いた ELISA 法を用いてスクリーニングした。

(A) ELISA によるスクリーニング

96 穴イムノプレートに 1：で得られた 1-カルボキシメチルウラシル-BSA 複合体 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ （BSA 換算）を $50 \mu\text{l}$ / ウェル入れ、 37°C で 2 時間放置した。放置後、0.1% Tween 20（和光純薬工業製）を含む PBS（日水製薬製、PBS-T）で 7 回洗浄した後、ブロッキングとして 3% BSA 含有 PBS を

20 $200 \mu\text{l}$ / ウェル添加し、 4°C で終夜静置し、更に PBS-T で 3 回洗浄して、抗原吸着プレートを調製した。

一方、(i)ハイブリドーマ培養上清 $30 \mu\text{l}$ に PBS 3

0 μ l を加えて 37℃ で 1 時間放置したもの、(ii) ハイ
ブリドーマ培養上清 30 μ l にウラシル (1mg/ml) 含有
PBS 30 μ l を加えて 37℃ で 1 時間放置したもの、
または (iii) 1 μ g / ml 正常マウス IgG (Biologica
5 l 社製) を、それぞれ 50 μ l / ウェルの割合で、上記で
調製した抗原吸着 96 穴プレートに添加し、37℃ で 1
時間放置した。次いで、該ウェルを PBS-T で 7 回洗
浄し、1% BSA 含有 PBS で 1000 倍に希釈したアル
カリホスファターゼ (AP) 標識抗マウス多価免疫グ
10 ロブリン抗体 (Sigma 社製) を 50 μ l / ウェル入
れ、37℃ で 1 時間放置した。その後、PBS-T で 7
回洗浄後、1 mg / ml になるように p-ニトロフェニ
ルリン酸二ナトリウム (和光純薬工業社製) を基質緩衝
液 (pH 9.8) に溶解した溶液を 100 μ l / ウェル
15 入れ、37℃ で 30 分放置した後、2N NaOH 50
 μ l / ウェル入れてプレートミキサーで混合して反応を
停止させ、マイクロプレートリーダーにて 415 nm の
吸光度を測定した。

吸収率は、実施例 1 の方法に従って求めた。

20 上記スクリーニングによる選別の結果、3 種のモノクロ
ーナル抗体産生細胞 (3H5、5C9 及び 5D10) が
得られた。

5 : クローニング

上記で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを公知慣用の限界希釈法を用いて、クローニングした。

- 5 具体的には、4 : で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの細胞数を数え、0.8個/0.25 ml/ウェルで10% FBS 及び10% BM condimed H1 (登録商標、ベーリンガーマンハイム社製) を含むRPMI 1640培地を用いてまき込み、CO₂濃度5%、37℃で10～14日間培養した。

得られたクローンを4 : に記載する方法と同様のELISA法を用いて選別を行った。その結果、数個のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマがウラシルに特異的な抗体を産生する細胞としてクローン化された。

15

実施例 5 免疫源としてウラシル誘導体－シュレッパー複合体の使用－2

1 : 免疫源 (ウリジンジアルデヒド－シュレッパー複合体) の調製

- 20 実施例 1 と同様にしてイムジェクト イムノーゲン EDC コンジュゲーション キット (Immject Immunogen EDC Conjugation Kit、Pierce社製) を用い、添付の

マニュアルに従って、ウリジンジアルデヒドにウシ血清アルブミン (BSA) を結合させ、ウリジンジアルデヒド-BSA複合体を調製した。具体的には、次の方法によって調製した。

5 1) BSA 200 μ g を 0.5 ml の 0.3 M NaHCO₃ 緩衝液 (pH 8.4) に溶解した。

2) ウリジンジアルデヒド 2 mg を 0.5 ml の 0.3 M NaHCO₃ 緩衝液 (pH 8.4) に溶解し、そのうちの 107 μ l を上記 1) で調製した BSA 溶液に加
10 えた。

3) 2) で調製した溶液を 4℃で一晩攪拌した。

4) これにウリジンジアルデヒドの 1.5 当量 (2.66 μ mol) の NaBH₄ を加え、氷上で 3 時間静置した。

5) 次いで、更にウリジンジアルデヒドの 1.5 当量
15 (2.66 μ mol) の NaBH₄ を加えて、再び 4℃で一晩攪拌した。

6) 酢酸を用いて pH 4.5 に調整し、該溶液をゲル濾過カラム (Sephadex G25) にかけて、未反応のウリジンジアルデヒドと低分子物質を除去した。

20 7) 6) で得られた溶液を D-ソルト デキストラン脱塩化カラム (D-salt Dextran Desalting Column) に添加し、溶出液を 0.5 ml / tube で分画した。それ

それぞれの画分の280nmおよび260nmにおける吸収を測定し、最初のピーク画分を集め、ウリジンジアルデヒド-B S A複合体溶液とした。

- 8) 複合体の確認は、ウリジンジアルデヒドのピリミジン骨格構造に由来するOD260nmの吸光度を分析することにより行った。その結果、B S A 1分子あたり27.8個のウリジンジアルデヒドが結合したと推定された。

かかる複合体は、実施例4と同様にハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の取得に利用することができる。

10

実施例 6 免疫源としてウラシル誘導体-シュレッパ-複合体の使用-3

1: 免疫源 (5-ブロモ-1-カルボキシメチルウラシル-シュレッパ-複合体) の調製

- 15 実施例1と同様にしてイムジェクト イムノーゲン E D C コンジュゲーション キット (Immject Immuno gen EDC Conjugation Kit、Pierce社製) を用い、添付のマニュアルに従って、5-ブロモ-1-カルボキシメチルウラシルにウシ血清アルブミン (B S A) またはヘモ
- 20 シアニン (K L H) を結合させ、5-ブロモ-1-カルボキシメチルウラシル-B S A (又はK L H) 複合体を調製した。具体的には、次の方法によって調製した。

1) 5-ブロモ-1-カルボキシメチルウラシル 4 mg を、1 ml 容量の conjugation buffer (0.1 M MES (2-(N-Morpholino)-ethane sulfonic acid)、0.9 M NaCl、0.02% NaN₃、pH 4.7) に
5 溶解した。

2) BSA (又は KLH) 10 mg を 1 ml の conjugation buffer に溶解した。

3) 2) で調製した BSA (又は KLH) 溶液 200 μ l に、1) の 5-ブロモ-1-カルボキシメチルウラ
10 シル溶液 50 μ l 及び 1-エチル-3-(3-ジメチル
-アミノプロピル) カルボジイミド (EDC) 125 μ l (KLH の場合は 50 μ l) を加えた。

4) 3) の溶液を 37℃ で 2 時間放置後、10,000 rpm で、5 分間遠心し、沈殿物を除いた。

15 5) 4) で得られた溶液を D-ソルト デキストラン
脱塩化カラム (D-salt Dextran Desalting Column) に添加し、溶出液を 0.5 ml / tube で分画した。それぞれの画分の 280 nm および 260 nm における吸収を測定し、最初のピーク画分を集め、5-ブロモ-1-
20 カルボキシメチルウラシル-BSA (または KLH) 複合体溶液とした。

6) 複合体の確認は、5-ブロモ-1-カルボキシメ

チルウラシルのピリミジン骨格構造に由来するOD 280nmの吸光度を分析することにより行った。その結果、5-プロモ-1-カルボキシメチルウラシル-B S A複合体に関して、B S A 1分子あたりに7.31個のウリジンアルデヒドが結合したと推定された。

かかる複合体は、実施例4と同様にハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の取得に利用することができる。

産業上の利用可能性

10 本発明のモノクローナル抗体は、ウラシルに対して特異的に反応することより、試料中のウラシルを簡便、迅速、且つ選択的に測定することができる。更に当該モノクローナル抗体は、シュードウリジン及びジヒドロウラシルに対しては全く反応性を示さないもので、ヒト尿試料
15 を検査することにより、D P D 欠損者の選定に有用であり、これは特にフッ化ピリミジン系抗腫瘍剤の投与が禁忌であるD P D 欠損癌患者のスクリーニングに極めて有用である。

本発明は、癌患者に対する抗腫瘍剤治療において安全
20 な治療法を選択する方法並びにそれに用いられるツールを提供する。

請求の範囲

1. ウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結
合物を免疫源として用いて作成される動物由来の抗体産
5 生細胞とミエローマとを細胞融合させて得られる、ウラ
シルに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生する
ことを特徴とするハイブリドーマ。
2. 上記モノクローナル抗体が、ウラシルに反応しシュ
ードウリジン及びジヒドロウラシルに反応しない特性を
10 有するものである、請求項1記載のハイブリドーマ。
3. 抗体産生細胞が、インビトロで動物由来の脾細胞に
ウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結合物
15 を接触させ、免疫化することにより調製されるものであ
る請求項1又は2に記載のハイブリドーマ。
4. 抗体産生細胞が、マウス由来の脾細胞から得られる
ものである請求項1乃至3のいずれかに記載のハイブリ
20 ドーマ。
5. シュレPPERに結合するウラシル若しくはその誘導

体が、ウラシル、置換基としてカルボキシメチル基を有するウラシル誘導体、置換基としてカルボキシル基を有するウラシル誘導体、ウリジンジアルデヒド、ウリジン 5'-リン酸、ポリウリジン酸、N-カルバミル- β -アラニン、オロチジン 5'-リン酸及びウリジン 5'-ジホスホグルクロン酸からなる群から選択される少なくとも 1 種である、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のハイブリドーマ。

10 6. シュレッパーに結合するウラシル若しくはその誘導体が、ウラシル、置換基としてカルボキシメチル基を有するウラシル誘導体、カルボキシル基を有するウラシル誘導体、ウリジンジアルデヒド及びウリジン 5'-リン酸からなる群から選択される少なくとも 1 種である、請求項 5 に記載のハイブリドーマ。

7. シュレッパーに結合するウラシル若しくはその誘導体が、ウラシル、置換基としてカルボキシメチル基を有するウラシル誘導体及びウリジンジアルデヒドからなる群から選択される少なくとも 1 種である、請求項 5 に記載のハイブリドーマ。

8. シュレPPERが、スカシガイのヘモシアニン又はウシ血清アルブミンである、請求項1乃至7のいずれかに記載のハイブリドーマ。

- 5 9. 免疫源として用いるウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結合物が、ウラシル-ヘモシアニン複合体、ウラシル-ウシ血清アルブミン複合体、1-カルボキシメチルウラシル-ヘモシアニン複合体、1-カルボキシメチルウラシル-ウシ血清アルブミン複合体、5-
10 -ブロモ-1-カルボキシメチルウラシル-ヘモシアニン複合体、5-ブロモ-1-カルボキシメチルウラシル-ウシ血清アルブミン複合体、ウリジンジアルデヒド-ヘモシアニン複合体及びウリジンジアルデヒド-ウシ血清アルブミン複合体からなる群から選択される少なくとも
15 も1種である、請求項8記載のハイブリドーマ。

10. ミエローマがマウスから得られる骨髓腫株化細胞である請求項1乃至9のいずれかに記載のハイブリドーマ。

20

11. 受託番号がFERM BP-6141であるハイブリドーマ。

12. 請求項1乃至11のいずれかに記載のハイブリドーマにより産生される、ウラシルに特異的に反応するモノクローナル抗体。

5

13. 請求項1乃至11のいずれかに記載のハイブリドーマにより産生され、ウラシルに反応し、シュードウリジン及びジヒドロウラシルに反応しない請求項12記載のモノクローナル抗体。

10

14. 請求項12又は13記載のモノクローナル抗体を用いて被検試料中のウラシルを検出又は定量することを特徴とするウラシルの免疫化学的測定法。

15 15. 被検試料のウラシルを検出又は定量する方法であって、請求項12又は13記載のモノクローナル抗体と被検試料を接触させ、放射性同位元素免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光抗体法又は凝集反応法のいずれかを用いることを特徴とするウラシルの免疫化学的測定法。

20

16. 下記：

(a) ウラシル若しくはその誘導体とシュレPPERとの結

合物からなる抗原の固相化物を含む反応系に、疑ウラシル含有被検試料及び請求項 1 2 又は 1 3 記載のモノクローナル抗体を配合する工程、

(b) 抗原－抗体複合体を形成させる条件下で、上記反応物をインキュベーションする工程、

(c) 固相化抗原－抗体複合体に第二抗体を反応させる工程、及び

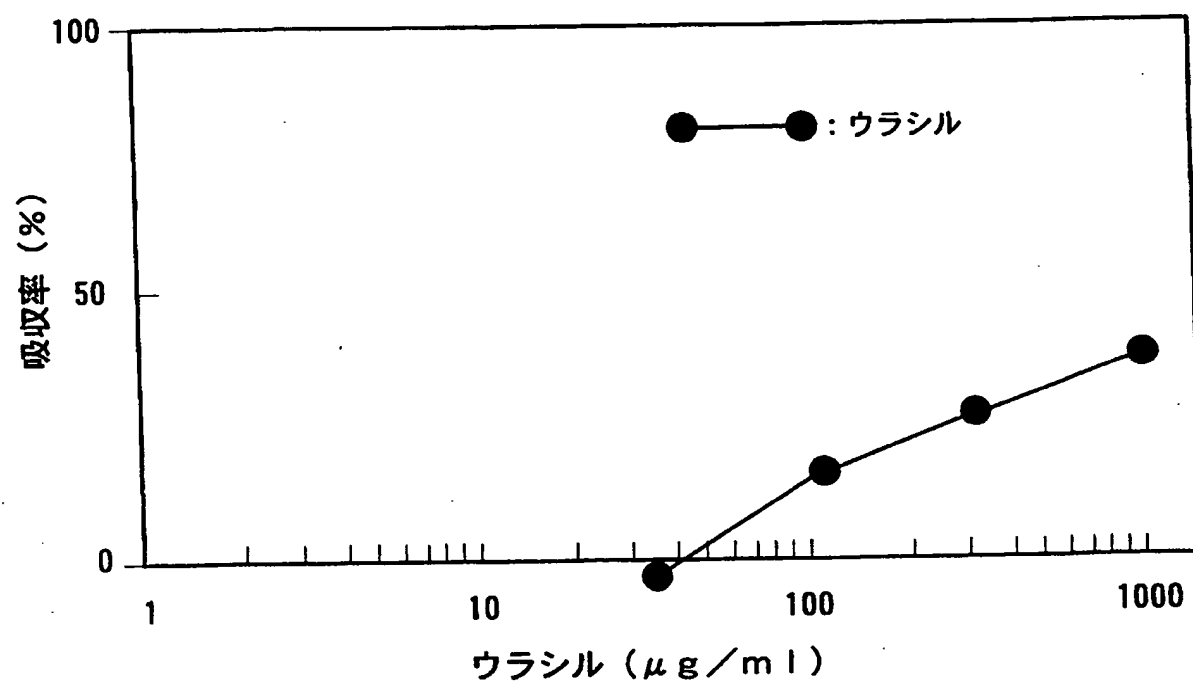
(d) 第二抗体と結合した固相化抗原－抗体複合体を検出する工程

10 を含む請求項 1 4 又は 1 5 記載のウラシルの免疫化学的測定法。

1 7. 被検試料が、尿試料である請求項 1 4 乃至 1 6 のいずれかに記載のウラシルの免疫化学的測定法。

1/1

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/06, C12P21/08, C12N5/12, G01N33/577, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/06, C12P21/08, C12N5/12, G01N33/577, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 62-299765, A (The Sendai Institute of Microbiology), 26 December, 1987 (26. 12. 87) (Family: none)	1, 3-10, 12, 14-17
X	JP, 63-222699, A (The Sendai Institute of Microbiology), 16 September, 1988 (16. 09. 88) (Family: none)	1, 3-10, 12, 14-17
A	ETHEL, G.O. et al., "Uracil-specific anti-R.N.A. antibodies in scleroderma", The Lancet (1975) Vol. 1, No. 7903 p.363-365	1, 3-10, 12, 14-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search
11 January, 1999 (11. 01. 99)

 Date of mailing of the international search report
19 January, 1999 (19. 01. 99)

 Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/06, C12P 21/08, C12N 5/12, G01N 33/577, G01N 33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/06, C12P 21/08, C12N 5/12, G01N 33/577, G01N 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 62-299765, A (財団法人 仙台微生物研究所) 26.12月.1987 (26.12.87) パテントファミリー無し	1, 3-10, 12, 14-17
X	JP, 63-222699, A (財団法人 仙台微生物研究所) 16.9月.1988 (16.09.88) パテントファミリー無し	1, 3-10, 12, 14-17
A	ETHEL, G. O. et al. "Uracil-specific anti-R. N. A. antibodies in scleroderma", The Lancet (1975) 第1巻, 第7903号 p. 363-365	1, 3-10, 12, 14-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.01.99

国際調査報告の発送日

19.01.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一



4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

PTO 03-5764

CY=WO DATE=19990429 KIND=A1
PN=99-20748

ANTI-URACIL MONOCLONAL ANTIBODY AND HYBRIDOMA PRODUCING THE SAME
[Kourashiru Monokuronaru Kotai Oyobi Sorewo Sanseisuru Haiburidoma]

Gen'ichiro Soma

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D. C. October 2003

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(10): JA
DOCUMENT NUMBER	(11): WO99/20748
DOCUMENT KIND	(12): A1
	(13): PUBLISHED UNEXAMINED APPLICATION (Kokai)
PUBLICATION DATE	(43): 19990429
PUBLICATION DATE	(45):
APPLICATION NUMBER	(21): PCT/JP98/04687
APPLICATION DATE	(22): 19981016
ADDITION TO	(61):
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51): C12N 15/06, C12P 21/08, C12N 5/12, G01N 33/577, 33/53
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):
PRIORITY COUNTRY	(33): JP
PRIORITY NUMBER	(31): 9/283442
PRIORITY DATE	(32): 19971016
INVENTOR	(72): SOMA, GEN'ICHIRO
APPLICANTS	(71): TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.; SOMA, GEN'ICHIRO
TITLE	(54): ANTI-URACIL MONOCLONAL ANTIBODY AND HYBRIDOMA PRODUCING THE SAME
FOREIGN TITLE	[54A]: Kourashiru Monokuronaru Kotai Oyobi Sorewo Sanseisuru Haiburidoma

Anti-Uracil Monoclonal Antibody and Hybridoma Producing the Same
Technical Field

The present invention pertains to monoclonal antibodies that react specifically with uracil and hybridoma that produces said monoclonal antibodies. The present invention further pertains to a method for an immunochemical assay for uracil that is characterized by the use of said monoclonal antibodies.

With the monoclonal antibodies of the present invention and an immunochemical assay using them, uracil that is present in biological samples, such as blood, urine, etc., can be detected and determined specifically, and this enables the screening of individuals who are genetically dihydropyrimidine-dehydrogenase deficient.

For said enzyme-deficient individuals, fluoropyrimidine anticancer drugs are contraindicated. Therefore, the present invention is especially useful as a tool for selecting a safe therapeutic method in administering anticancer-drug therapy for cancer patients.

Prior Art

Fluoropyrimidine compounds, such as fluorouracil, etc., are one of anticancer drugs that are used currently. Among cancer patients, however, there are individuals who are genetically deficient in dihydropyrimidine dehydrogenase (hereinafter shortened to DPD), which is an enzyme that participates in the destructive metabolism of said compounds (approximately 3% of Caucasian breast cancer patients), and it has been reported that, if fluoropyrimidine anticancer drugs are administered to said DPD-deficient patients, side effects that lead to death could occur [Biochim. [sic] Biophys. Acta 633, 400-409 (1980)].

/2

In living bodies, uracil or thymine are usually metabolized into dihydrouracil and dihydrothymine, respectively, by the action of DPD, but it has been known that, in DPD deficient patients, these are not metabolized, and large quantities of uracil or thymine, uracil in particular, are discharged into blood or urine [Adv. Exp. Med. Biol., 253A, 111-118 (1989)].

Therefore, if the presence of uracil or thymine, especially uracil, in blood or urine can be determined prior to the

* Number in the margin indicates pagination in the foreign text.

administration of fluoropyrimidine anticancer drugs to cancer patients, DPD-deficient cancer patients can be screened beforehand; as a result, it becomes possible to reduce the dosage of the anticancer drugs or to stop their use so as to prevent the occurrence of serious side effects.

As a conventional uracil-determination method, a method that uses high-performance liquid chromatography (HPLC) is known [Journal of Chromatography B, 672 (1995), 233-239.] This method, however, has many disadvantages. For example, preparation of samples is troublesome and requires considerable labor and experience. Furthermore, it requires many hours when testing a large number of test samples and also requires very expensive measurement apparatuses and equipment. Accordingly, there is a need for a new uracil assay that is highly sensitive, quick, simple, and cost effective. /3

As a technique similar to the present invention, in JP-B-H04-21479 is described an immunoassay that uses a monoclonal antibody to pseudouridine. The monoclonal antibody used here has a 30 to 40% reactivity to uracil, but it was developed originally for detecting pseudouridine as the tumor marker, which increases in the urine of progressive cancer patients, and it exhibits a high reactivity of 95 to 99% to pseudouridine. Therefore, with the use of such a monoclonal antibody that has cross-reactivity between uracil and pseudouridine, it is impossible to screen DPD-deficient individuals and normal individuals that do not have a DPD deficiency among cancer patients.

Therefore, in order to screen DPD-deficient individuals and normal individuals among cancer patients, there is a need for a method that can detect uracil specifically, without causing a cross-reaction with dihydrouracil, which is an in vivo metabolite of uracil, and with pseudouridine used as the tumor marker. /4

The present invention intends to provide monoclonal antibodies that react specifically with uracil and hybridoma that produces said monoclonal antibodies.

The present invention also intends to provide a simple, quick, and specific uracil immunochemical assay that is characterized by the use of said anti-uracil monoclonal antibodies.

Brief Explanation of the Drawing

Figure 1 is a graph that shows the result of the study of the reactivity of the monoclonal antibody of the present invention obtained in Working Example 1 to uracil by indirect competitive inhibitory ELISA (Working Example 2). The horizontal axis indicates

the quantity of uracil ($\mu\text{g/ml}$), and the vertical axis indicates absorbance (%).

Disclosure of the Invention

The present inventor was studying the characteristics of the monoclonal antibodies that were obtained by preparing antibody-producing cells using, as the immunogen, antigens prepared by binding uracil or its derivatives with a schlepper, by preparing hybridoma from these cells with a cell fusion technology, and by producing monoclonal antibodies from said hybridoma, and, during this study, the present inventor learned that the obtained monoclonal antibodies had the property of reacting specifically with uracil, without reacting with pseudouridine and dihydrouracil. Based on this finding, the present inventor, through further research, confirmed that, by utilizing this property of said monoclonal antibodies, uracil discharged into urine could be measured by an immunochemical assay selectively as well as quickly and easily, without pretreating said sample, thereby achieving the present invention. /5

That is, a first aspect of the present invention pertains to a hybridoma that produces and secretes monoclonal antibodies that react specifically with uracil and also to a method for its preparation.

More specifically, said hybridoma is obtained by the cell fusion of myeloma and an animal-origin antibody-producing cell that is prepared using, as the immunogen, a conjugate of uracil or a derivative thereof and of a schlepper, and this hybridoma has a characteristic of producing monoclonal antibodies that react specifically with uracil.

The following lists the embodiments of the hybridoma of the present invention.

- (1) The aforesaid hybridoma wherein the produced monoclonal antibody has a characteristic of reacting with uracil but not reacting with pseudouridine and dihydrouracil. /6
- (2) The aforesaid hybridoma wherein the antibody-producing cells used here are prepared by bringing animal-origin spleen cells into contact in vitro with a conjugate of uracil or its derivative and of a schlepper to immunize them.
- (3) The aforesaid hybridoma wherein the animal-origin spleen cells are derived from mouse spleen cells.

(4) The aforesaid hybridoma wherein the uracil or its derivative that bonds with a schlepper is a minimum of one kind selected from a group consisting of uracil; uracil-4-acetic acid; uracil derivatives having a carboxymethyl group, such as 1-carboxymethyl uracil, 5-bromo-1-carboxymethyl uracil, 5-fluoro-1-carboxymethyl uracil, etc.; uracil derivatives having a carboxyl group, such as uracil-5-carboxylic acid, uracil-6-carboxylic acid, uridine-6-carboxylic acid, etc.; uridine dialdehyde; uridine 5'-phosphate; polyuridic acid; N-carbamyl- β -alanine; orotidine 5'-phosphate; and uridine 5'-diphosphoglucuronate.

(5) The aforesaid hybridoma wherein the schlepper is keyhole limpet hemocyanin or bovine serum albumin. /7

(6) The aforesaid hybridoma wherein a conjugate of uracil or its derivative and a schlepper, which is used as the immunogen, is a minimum of one kind selected from a group consisting of a uracil-hemocyanin complex, uracil-bovine serum albumin complex, 1-carboxymethyl uracil-hemocyanin complex, 1-carboxymethyl uracil-bovine serum albumin complex, 5-bromo-1-carboxymethyl uracil-hemocyanin complex, 5-bromo-1-carboxymethyl uracil-bovine serum albumin complex, uridine dialdehyde-hemocyanin complex, and uridine dialdehyde-bovine serum albumin complex.

(7) The aforesaid hybridoma wherein the myeloma used here is a myeloma cell line obtained from mice.

(8) The aforesaid hybridoma that is deposited with the National Institute of Bioscience and Human-Technology of the Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (Japan) and whose accession number is FERM BP-6141.

A second aspect of the present invention pertains to a monoclonal antibody that is produced by either one of the aforesaid hybridomas and that reacts specifically with uracil. Preferably, it is a monoclonal antibody that has a characteristic of reacting with uracil but not with pseudouridine or dihydrouracil.

A third aspect of the present invention pertains to a uracil immunochemical assay that is characterized by the use of either one of the aforesaid anti-uracil monoclonal antibodies. /8

As a specific embodiment of this uracil immunochemical assay, there is a method in which the aforesaid anti-uracil monoclonal antibody and a specimen to be tested that is suspected of the presence of uracil are brought into contact, and, using either a radioimmunoassay, enzyme immunoassay, fluorescent antibody technique, or agglutination reaction method, uracil in the test sample is

detected or quantified, or there is a uracil immunochemical assay that contains the following process steps:

(a) a step of blending a specimen suspected of containing uracil and the aforesaid monoclonal antibody in a reaction system that contains a solid-phase product (hereinafter may also be referred to as an immobilized antigen) obtained by immobilizing an antigen comprised of a conjugate of uracil or its derivative and a schlepper on a given carrier,

(b) a step of incubating the aforesaid reaction product under conditions in which an antigen-antibody complex is formed,

(c) a step of reacting a secondary antibody with the immobilized antigen-antibody complex, and

(d) a step of detecting the immobilized antigen-antibody complex that has bound with the secondary antibody.

First of all, the following explains the first aspect of the invention, that is, a hybridoma that has a characteristic of synthesizing and secreting monoclonal antibodies specific to uracil and its preparation method. /9

Uracil or a derivative thereof that is used as the immunogen in the preparation of the hybridoma of the present invention is not limited in any specific way, but, because it exhibits extremely weak immunogenicity by itself, it is preferable to bind it with an appropriate schlepper and use it in the form of a uracil (or a derivative thereof)-schlepper complex.

The schlepper here means a carrier, and it is a substance that couples with a material that has extremely weak immunogenicity or with a material that does not have an antibody-producing capacity by itself, like a haptenic group, thereby strengthening or expressing immunogenicity.

As a schlepper, proteins having a relatively large molecular weight are generally employed. In addition, such cells as red blood cells, polysaccharides, and so forth are also used. Some examples of the schlepper include keyhole limpet hemocyanin (KLH), ovalbumin (OVA), bovine serum albumin (BSA), rabbit serum albumin, etc., of which KLH and BSA are preferable.

As the immunogen, the present invention can use uracil derivative-schlepper complexes, which have uracil derivatives /10

in the place of uracil in the uracil-schlepper complex. The uracil derivative is not limited in any specific way, and some common examples include uracil-4-acetic acid; uracil derivatives having a carboxymethyl group as the substituent, such as 1-carboxymethyl uracil, 5-bromo-1-carboxymethyl uracil, 5-fluoro-1-carboxymethyl uracil, etc.; and uracil derivatives having a carboxyl group as the substituent, such as uracil-5-carboxylic acid, uracil-6-carboxylic acid, uridine-6-carboxylic acid, etc., as well as uridine dialdehyde, uridine 5'-phosphate, polyuridic acid, N-carbamyl- β -alanine, orotidine 5'-phosphate, uridine 5'-diphosphoglucuronate, etc. Preferable uracil derivatives include uracil derivatives that have a carboxymethyl group as the substituent, uracil derivatives that have a carboxyl group as the substituent, uridine dialdehyde, and uridine 5'-phosphate, of which uracil derivatives that have a carboxyl group as the substituent and uridine dialdehyde are more suitable. Some examples of the especially preferable uracil derivatives include 1-carboxymethyl uracil, 5-bromo-1-carboxymethyl uracil, and uridine dialdehyde. /11

The conjugation method of uracil or its derivative and a schlepper is not limited in any specific way, and it may be carried out by a method known to the art, such as the mixed anhydride procedure [B. F. Erlanger, et al.: J. Biol. Chem., 234, 1090-1094 (1954)], the activated ester method [A. E. Karu, et al.: J. Agric. Food Chem., 42, 301-309 (1994)], and the like. As a simple method, using an immject immunogen EDC conjugation kit (a product of Pierce Co.), the conjugation can be carried out according to the manual included in the product.

Antibody-producing cells can be prepared by inoculating animals with the aforesaid immunogen according to a conventional method or by bringing the immunogen into contact with animal cells and immunizing in vivo or in vitro. The present invention preferably employs in vitro immunization [Methods Enzymol., (1986), 121; Immunochem. Tech., Pt. I, 27-33; J. Immunological Methods (1982), 53, 261-291; and the like.]

One concrete example of this in vitro immunization is a method according to which a spleen is taken from a 3- to 10-week-old animal, and spleen cells prepared from the spleen are incubated in vitro together with a uracil (or its derivative)-schlepper complex to sensitize them. Here, for the purpose of boosting immunity of the cells, it is preferable to use muramyl dipeptide derivatives, such as romurtide, muramyl dipeptide (MDP), etc., or lipopolysaccharides, etc. The use of muramyl dipeptide derivatives is especially preferable. /12

The origin of the aforesaid spleen is not specifically limited, and a spleen from a wide range of animals, including mice, rats, horses, goats, rabbits, etc., can be used. That is, the cells from

which the antibody-producing cells used in the present invention are derived can be selected appropriately for use from the spleen cells of the aforesaid animals, taking into account compatibility with myeloma and so forth. Mouse-derived spleen cells are preferably used.

The myeloma cells to be fused with the aforesaid antibody-producing cells are not specifically limited, and those derived from mice, rats, horses, goats, rabbits, humans, etc., can be listed as some examples. It is desirable that the myeloma cells be derived from the same kind of animal from which the antibody-producing cells are derived. For example, myeloma cells derived from mice can be cited.

If the antibody-producing cells are derived from mouse spleen cells, for example, it is preferable to use a myeloma cell line obtained from mice as the myeloma cells to be fused. More specifically, it is preferable to use an 8-azaguanine-resistant mouse (BALB/c origin) myeloma cell line, some examples of which include P3/X63-Ag8 /13 (X63) [Nature, 256, 495-497 (1975)], P3/X63-Ag8. U1 (P3U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1987)], P3/NSI-1-Ag4-1 (NS-1) [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)], Sp2/O-Ag14 (Sp2/O) [Nature, 276, 269-270 (1978)], FO [J. Immuno. Meth., 35, 1-21 (1980)], MPC-11, X63.653, S194, etc., of which P3U1 cells are especially preferable.

The fusion of the aforesaid antibody-producing cells and myeloma cells can be carried out by a method known to the art, such as the method described in Nature, 256, 495-497 (1975), the method described in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 5122-5126 (1981), or methods similar to these methods.

More specifically, the cell fusion can be achieved by allowing the aforesaid antibody-producing cells and myeloma cells to coexist in a normal nutrient medium in the presence of, for example, a fusion promoter. The fusion promoter is not limited in any specific way, and those that are commonly used, such as polyethylene glycol (PEG), sendai virus, etc., can be used here [Cytochemistry/Histochemistry, (Shuji Yamashita, et al., Japanese Society of Histochemistry and Cytochemistry; Gakusai Kikaku, 1986) and the like]. It is preferable to use PEG owing to its relatively low cytotoxicity and simple fusion procedure. For the purpose of increasing fusion efficiency, a /14 coadjuvant, such as dimethylsulfoxide (DMSO), etc., may also be used in combination, if so desired.

In the place of the aforesaid fusion method that uses a fusion promoter (for example, the aforesaid polyethylene glycol method), it is also possible to employ optionally a fusion method by electrical processing (electrical fusion method).

The ratio of the antibody-producing cells to myeloma cells used here is similar to the ratio used in a standard method. For example, the antibody-producing cells are used in numbers that are 2 to 10 times or thereabouts, preferably, 4 to 7 times or thereabouts, the number of myeloma cells.

The screening of hybridoma colony that has acquired the antibody-producing capacity and growth capacity through the fusion of the antibody-producing cells and myeloma cells can be carried out by a culture using a common screening medium.

If, for example, 8-azaguanine-resistant strain is used as the myeloma cell line, HAT medium can be used as the screening medium here. The culture in HAT medium should be carried out for a period that is sufficient for the non-fused cells, etc., other than the target hybridoma to die, that is, usually for 3 to 10 days.

The hybridoma thus obtained is subsequently used, according to /15 a conventional method, in the processes for screening and cloning the strain that produces the target anti-uracil monoclonal antibodies.

The screening of the strain that produces the anti-uracil monoclonal antibodies can be carried out by taking a part of the culture supernatant that contains the hybridoma colonies obtained as described in the foregoing and, with this as a sample, by detecting and identifying the uracil contained in it by various kinds of methods commonly used for antibody detection (Hybridoma Method and Monoclonal Antibody, published by the R&D Planning Co., pp. 30 - 53, March 5, 1982)—for example, by radioimmunoassay (RIA). Some examples of the antibody detection method include enzyme immunoassay (ELISA method) [Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439 (1980)], fluorescent antibody technique, plaque method, spot method, blood-cell agglutination reaction, ouchterlony, etc., of which the ELISA method is preferable from the viewpoint of sensitivity, fastness, precision, safety, automation, etc.

More specifically, the screening of the strain that produces the anti-uracil monoclonal antibodies can be carried out, for example, by indirect competitive inhibitory ELISA according to the following procedure.

(a) As the antigen, a uracil (or its derivative)-schlepper complex /16 is adsorbed to a carrier to immobilize it.

(b) The solid-phase surface to which the antigen is not adsorbed is blocked by a protein that is unrelated to the antigen.

(c) Into this is added a uracil-containing sample and a hybridoma culture supernatant as so as to cause the monoclonal antibodies contained in the hybridoma culture supernatant to competitively bind with the immobilized antigen and free uracil, thereby producing an immobilized antigen-antibody complex and a free uracil-antibody complex.

(d) The free uracil-antibody complex is eliminated by washing, and the immobilized antigen-antibody complex is reacted with an enzyme-marked secondary antibody.

(e) Using a substrate that is appropriate for the enzyme, an enzyme-substrate reaction is carried out, and absorbance is measured.

In the aforesaid process step (a), various kinds of immunogens described before can be used as the uracil (or its derivative)-schlepper complex used as the immobilized antigen.

It is, as a principle, preferable to use the immobilized antigen that is the same as the immunogen used in the preparation of the antibody-producing cells. However, the schlepper that binds with uracil or a uracil derivative does not have to be the same in the immobilized antigen and immunogen, and it is possible, for example, /17 to use a uracil-BSA complex as the immunogen while using uracil-KLH as the immobilized antigen.

The carrier that immobilizes the antigen is not limited in any specific way, and any carriers that are used commonly in an ELISA method can be used here. Some examples include microplates or beads made from polystyrene or polyvinyl, and 96-well microplates are preferably used. The concentration of the antigen is not limited specifically and can be selected from a wide range appropriately, but it is usually in the range of 0.01 to 100 $\mu\text{g/ml}$ or thereabouts, preferably in the range of 0.05 to 5 $\mu\text{g/ml}$ or thereabouts. With respect to its volume, in the case of using a 96-well microplate as the carrier, a volume that is enough to cover the bottom of the wells is sufficient, and 20 to 150 μl or thereabouts per well is usually desirable.

The adsorption conditions are not limited in any specific way, but a method of leaving the system standing still at 4 to 40°C for 1 hour to overnight is usually suitable, and leaving it standing still at 37°C or thereabouts for approximately 2 hours is preferable.

As the protein used for the blocking in the process step (b), calf serum, ovalbumin, bovine serum albumin, fetal calf serum (FCS), etc., for example, can be used, of which calf serum is preferable. The conditions under which the blocking is carried out are not specifically limited, and a method of leaving the system standing still at 4 to 40°C for 1 hour to overnight is usually suitable, and leaving it standing still at 37°C or thereabouts for approximately 2 /18 hours is preferable. After the blocking, the microplate is washed with a buffer solution. The buffer solution used here is not specifically limited, and a phosphate buffer solution (PBS) (pH 7.3 - 7.7) containing Tween 20 is suitable.

The specific conditions under which the process step (c) is conducted are not limited in any specific way, and a method of leaving the system standing still at room temperature to 40°C for about 0.5 to 3 hours is usually suitable, and leaving it standing still at 37°C or thereabouts for approximately 1 hour is preferable. After the reaction, the microplate is washed with a buffer solution. The buffer solution used here is not limited specifically, and, for example, PBS (pH 7.3 - 7.7) containing Tween 20 is suitable.

As the secondary antibody in the process step (d) are used enzyme-labeled anti-mouse immunoglobulin antibodies that are labeled with such enzymes as alkaline phosphatase (AP), horseradish peroxidase (HRPO), β -galactosidase (β -GS), glucose oxidase (GO), urease, etc., of which an AP-labeled anti-mouse immunoglobulin antibody is preferable. The secondary antibody is usually diluted for use, and it is preferable to dilute the secondary antibody to about 100 to 10,000, /19 preferably about 200 to 500, times the monoclonal antibody (the primary antibody) bound to the microplate by means of the uracil-schlepper complex. It is preferable to use PBS (ph 7.3 - 7.7) containing 1% bovine serum albumin for this dilution. The reaction conditions are not limited specifically, but it is usually carried out at about 37°C for about 1 hour, and, after the reaction, washing with a buffer solution is carried out.

With this reaction, the secondary antibody bonds with the monoclonal antibody that is bound to the microplate by means of the immobilized antigen.

In the process step (e), the substrate develops a color by the reaction of the enzyme of the bound secondary antibody and the substrate, or a coloring reagent is further added to the reaction system, and the change in absorbance is measured. More specifically, taking as an example the case of using alkaline phosphatase as the marker enzyme that is bound to the secondary antibody, a suitable

method is to carry out an enzyme reaction using p-nitrophenyl phosphate as the substrate, thereby causing the substrate to develop a color, to terminate the enzyme reaction by adding 2N NaOH, and to measure absorbance at 415 nm. On the other hand, in the case of using peroxidase as the marker enzyme to be bound with the secondary antibody, it is desirable to use hydrogen peroxide as the substrate and o-phenylene diamine as the coloring reagent. In this case, although not specifically limited to the following, it is a common practice to allow the reaction to take place at about 25°C for approximately 10 minutes after the addition of the coloring reagent solution and subsequently to terminate the enzyme reaction by the addition of 4N sulfuric acid. When o-phenylene diamine is used as the coloring reagent, absorbance is measured at 492 nm. Here, it is also possible to employ a sensitization method using the avidin-biotin system. /20

Next, the hybridoma that has been confirmed by the screening mentioned in the foregoing to produce monoclonal antibodies specific to uracil is cloned.

Some examples of the cloning method include a method by limiting dilution in which the dilution is carried out to give one hybridoma per well, a method of seeding the hybridoma in a soft agar medium and collecting colonies, a method of picking one cell with a micromanipulator, a "sorter cloning" method with which one cell is separated with a cell sorter, and the like. Owing to its simplicity, the limiting dilution method is preferably used.

With the wells that contain hybridomas that have been found to have an antibody titer, cloning is repeated one to four times by, for example, limiting dilution, and those exhibiting antibody titer stably are selected as the anti-uracil monoclonal antibody-producing hybridoma strains.

The hybridoma of the present invention obtained by the aforesaid method can be stored at -80°C or below—for example, at -195°C in liquid nitrogen—by freezing, for example, 5×10^6 cells/ml or more in a RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS), using, as necessary, 10 % dimethylsulfoxide as a freeze stabilizing agent. /21

As described later, the hybridoma of the present invention is stable when cultured in a basal medium, such as RPMI 1640, DMEM, IMEM, etc., and produces and secretes the monoclonal antibodies that have specific reactivity to uracil. Furthermore, these cell strains can be stored in liquid nitrogen stably and can be recovered from it easily. In other words, the hybridoma of the present invention is useful as a

source from which pure monoclonal antibodies that react with the uracil antigen can be obtained easily.

This hybridoma was deposited with the National Institute of Bioscience and Human-Technology of the Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, whose address is Higashi 1-chome 1-ban 3-go, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan, on October 14, 1997 as "Mouse Hybridoma SU-1," [microorganism designation (given by the depositor for identification purpose)], "FERM BP-6141" (accession number).

The following explains the second aspect of the invention, a monoclonal antibody that specifically reacts with uracil.

This monoclonal antibody is produced by the hybridoma of the present invention obtained by the aforesaid method. /22

This monoclonal antibody is prepared by culturing the aforesaid hybridoma.

Some examples of the medium used for culturing the hybridoma include such basal media as RPMI 1640, DMEM, IMEM, etc., of which RPMI 1640 is preferable. To these media, fetal calf serum, human transferrin, etc., may be added for the purpose of promoting cell proliferation and cell differentiation, 10% BM condimed H1 (a trade name, a product of Boehringer Mannheim Co.) may be added for the purpose of promoting cell proliferation, and/or L-glutamine, sodium pyruvate, etc., may be added as an energy source.

The culture of the hybridoma is preferably carried out at a CO₂ concentration of 4 to 6% and at a temperature of 36 to 38°C. Large-scale culture is carried out by rotary culture, etc., using large-size culture bottles.

The supernatant of this culture can be used directly as a source of the anti-uracil monoclonal antibody, but it may be processed by dialysis, salting-out with ammonium sulfate, gel filtration, freeze-drying, etc., to collect immunoglobulin fractions, which may be further purified if so desired, thereby obtaining the anti-uracil monoclonal antibody.

The aforesaid fraction purification procedure is not limited specifically, and conventional methods, such as high-performance liquid chromatography (HPLC), etc., including ion-exchange chromatography on a DEAE-sepharose column, affinity chromatography on a protein A-sepharose column, and the like can be used. /23

The anti-uracil monoclonal antibody of the present invention obtained by the aforesaid process can be evaluated for its cross-reactivity by utilizing the aforesaid indirect competitive inhibitory ELISA, etc. More specifically speaking, this evaluation can be carried out by adding to the wells a compound whose cross-reactivity is to be studied in the place of uracil when conducting the competitive reaction in the aforesaid ELISA.

Through this cross-reactivity evaluation, it was found that the anti-uracil monoclonal antibody of the present invention had a specificity to uracil, reacting with uracil but cross-reacting little with pseudouridine and dihydrouracil, as described in the working examples.

Thus, the monoclonal antibody of the present invention has a high reactivity to uracil, and, furthermore, it can be generated homogeneously and in large volume by culturing the hybridoma of the present invention; therefore, it is useful as a reagent for specifically detecting and determining uracil immunochemically. This /24 monoclonal antibody can also be used for purification of uracil.

Since the reaction specificity of the monoclonal antibody of the present invention is such that the monoclonal antibody does not react with pseudouridine and dihydrouracil, which could be present in urine of cancer patients as foreign substances, the monoclonal antibody of the present invention is effective especially for the screening of cancer patients to identify DPD-deficient individuals, who discharge uracil into urine due to DPD deficiency, and normal individuals who do not have DPD deficiency.

Accordingly, the third aspect of the present invention is a uracil immunochemical assay that is characterized by the use of the aforesaid anti-uracil monoclonal antibody of the present invention.

Immunochemical assay is a technique that detects and measures an antigen contained in a specimen based on the antigen-antibody reaction that is brought about by the specific recognition of the antigen by the antibody, and, because it is excellent in respect to accuracy, convenience, speed, and cost, it is widely used in the field of biochemical testing, clinical diagnostics, etc.

Many known methods can be cited as the immunochemical assay here, and some specific examples include, as described before, the RIA method, enzyme immunoassay (ELISA method), fluorescent antibody technique, blood-agglutination reaction, etc. Of these, the ELISA method is preferable, and its effectiveness is described in detail /25

in "Practice and theory of enzyme immunoassays" by P. Tijssen in Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology [Elsevier Amsterdam New York, Oxford ISBN 0-7204-4200-1 (1990).]

The operation and procedures in each of the aforesaid immunochemical assays can be carried out basically by following the conventional methods, except that the anti-uracil monoclonal antibody is used as the primary antibody.

The immunochemical assay of the present invention is not restricted in respect to its concrete objective, application target, and so forth as long as it is used for a specimen suspected of containing uracil as the target so as to specifically detect or measure (quantify) uracil contained in it. In the case of, for example, using it for diagnostic purposes, such as for screening dihydropyrimidine-dehydrogenase (DPD) deficient individuals from normal individuals who do not have this deficiency, body fluids, such as urine, blood serum, blood plasma, etc., can be used as the specimen.

Biological samples, such as urine, etc., can be subjected to the immunochemical assay directly, or they may be pretreated with ion-exchange resin, etc.

It is preferable for the immunochemical assay of the present invention to basically include a process step of incubating the biological sample of a test subject together with the anti-uracil monoclonal antibody of the present invention under conditions for forming an antigen-antibody complex and a process step of detecting the formed antigen-antibody complexes. In designing this immunochemical assay, various modifications, such as the direct method, indirect method, competitive method, sandwich method, etc., which are conventionally practiced in the technical field of the present invention, can be introduced. /26

More specifically, taking, as an example, the solid-phase ELISA method that uses human urine samples, the detection and determination of uracil can be carried out as follows.

First, the anti-uracil monoclonal antibody of the present invention is immobilized on a desired carrier in advance, and the solid-phase surface that is not coated with the antibody is coated with a protein that is unrelated to the antigen. After the surface is washed, a urine sample as the specimen and an enzyme-marked antigen—for example, an enzyme-labeled uracil (or its derivative)-schlepper complex—are added to bring about a competitive reaction. To this reaction system is added an enzyme substrate, and the decrease of the absorbance caused by the addition of the specimen is measured. More

specifically, by determining the presence or absence of the decrease of the absorbance caused by the addition of the specimen, the presence or absence of uracil in the urine sample can be determined, and, by measuring the degree of the decrease of the absorbance caused by the addition of the specimen, the quantity of the uracil in the urine sample can be determined from a standard curve prepared from known quantities of uracil. /27

It is also possible to use a method in which, in the already-described indirect competitive inhibitory ELISA, a urine sample is used in the place of a sample containing uracil, and the anti-uracil monoclonal antibody is used in the place of the hybridoma culture supernatant. With this indirect competitive inhibitory ELISA, the monoclonal antibody of the present invention can measure uracil in the range of 100 to 1,000 $\mu\text{g/ml}$ in a specimen.

For implementing the aforesaid immunochemical assay, it is convenient to utilize a reagent kit that contains the anti-uracil monoclonal antibody of the present invention.

Accordingly, the present invention pertains to a reagent kit for uracil immunochemical assays that contains the aforesaid anti-uracil monoclonal antibody of the present invention.

More specifically, it pertains to a reagent kit for uracil-immunochemical-assay use that is a reagent kit used for detecting or quantifying uracil in specimens and that is characterized by containing, at a minimum, any of the aforesaid monoclonal antibodies or by further containing a conjugate of uracil or its derivative and of a schlepper in addition to any of the aforesaid monoclonal antibodies. Here, urine samples are preferably used as specimens. /28

The reagent kit of the present invention is characterized by containing the anti-uracil monoclonal antibody as the active constituent, but it may be a set comprised of, in addition to this active constituent, a combination of one to five components selected from a solid-phase carrier, marking agent, substrate (detection-use reagent) appropriate for the marking agent, antigen, and secondary antibody (for example, anti-mouse immunoglobulin, etc.) Here, a conjugate of uracil or its derivative and a schlepper is preferably used as the antigen. As the solid-phase carrier, marking agent, substrate (detection-use reagent) appropriate for the marking agent, and secondary antibody, those described before can be used.

When the set contains a marking agent, the marking agent may be conjugated with an optional constituent, such as the secondary antibody, etc., beforehand. Some examples of the marking agent include

various kinds of compounds, such as radioactive isotopes, enzymes, fluorescent materials, etc., but enzymes are preferable for various reasons, including ease of use, etc.

Furthermore, to facilitate assay implementation, this reagent kit may also contain an appropriate diluent solution for the antibody or antigen, reaction diluent solution, buffer, washing solution, substrate-dissolving agent, reaction-terminating solution, solid-phase adsorption inhibitor, etc.

Best Modes of Implementing the Invention

/29

The following presents working examples to explain the present invention, but these working examples do not limit the technical scope of the present invention at all. Those skilled in the art can introduce modifications or changes to the present invention easily, based on the description given in the present specification, and any of these modifications and changes are also included in the technical range of the present invention.

Working Example 1

1: Preparation of Immunogen

Using an Immject Immunogen EDC Conjugation Kit (a product of Pierce Co.), bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH) was coupled with uracil according to the attached manual, thereby preparing a uracil-BSA complex or uracil-KLH complex. More specifically, the following method was used for the preparation.

(A) Preparation of Uracil-BSA Complex

- 1) The BSA included in the kit was dissolved in 200 μ l injection solvent (a product of Otsuka Pharmaceutical Plant Co.)
- 2) Uracil (2 mg) was dissolved in a buffer solution (500 μ l) included in the kit.
- 3) The solution prepared in (2) was added to the solution prepared in /30 (1).
- 4) The solution obtained in (3) was added to 10 mg of 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide (EDC) included in the kit.
- 5) After the solution obtained in (4) was left standing for 2 hours at room temperature, it was centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes, and the precipitate was eliminated.

6) The solution obtained in (5) was added to the D-salt dextran desalting column included in the kit, and the eluate was fractionated at 0.5 ml/tube. The absorbance of each fraction at 280 nm and 260 nm was measured, and the first-peak fractions were pooled and used as the uracil-BSA complex solution.

7) The obtained complex was decomposed by a protease, and the decomposition product was analyzed using HPLC, thereby finding the composition of the complex. As a result, it was learned that BSA : uracil (mole ratio) = 1 : 0.16 to 0.72.

(B) Preparation of Uracil-KLH Complex

1) The KLH included in the kit was dissolved in 200 μ l injection solvent (a product of Otsuka Pharmaceutical Plant Co.)

2) Uracil (2 mg) was dissolved in a buffer solution (500 μ l) included in the kit.

3) The solution prepared in (2) was added to the solution prepared in /31 (1).

4) EDC (10 mg) was dissolved in 1 ml injection solvent, and 50 μ l of this solution was added to the solution obtained in (3).

5) After the solution obtained in (4) was left standing for 2 hours at room temperature, it was centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes, and the precipitate was eliminated.

6) The solution obtained in (5) was added to the D-salt dextran desalting column included in the kit, and the eluate was fractionated at 0.5 ml/tube. The absorbance of each fraction at 280 nm and 260 nm was measured, and the first-peak fractions were pooled and used as the uracil-KLH complex solution.

7) The obtained complex was decomposed by a protease, and the decomposition product was analyzed using HPLC, thereby finding the composition of the complex. As a result, it was learned that KLH : uracil (mole ratio) = 1 : 2.

2: Preparation of Immune cells (antibody-producing cells) by In Vitro Immunization

(A) Preparation of Spleen Cells

Spleens were extracted from two BALB/c mice and placed in a 6 cm-diameter plastic petri dish. Into this plastic petri dish, 5 ml of RPMI 1640 medium was poured, and the extracted spleens were washed in it. Separately, two 6 cm-diameter plastic petri dishes, in each of /32 which was placed 5 ml of RPMI 1640 medium, were prepared, and the spleens were further washed twice in these. The aforesaid washing operation was repeated in the same manner inside a clean bench. Inside the petri dish used lastly for the washing, the spleens were mashed, and the spleen cells were suspended in RPMI 1640 medium. This cell suspension was transferred to a 15 ml-capacity centrifuging tube and centrifuged at 1,000 rpm at room temperature for 7 minutes, and the supernatant was eliminated. The precipitated cells were suspended in 10 ml of RPMI 1640 medium and left standing at room temperature for 3 minutes. While being careful not to suck up any of the tissue pieces that had settled to the bottom of the centrifuging tube, the cell suspension was transferred to 50 ml-capacity centrifuging tube. The cells prepared by the aforesaid process were used for the subsequent in vitro immunization.

(B) In Vitro Immunization

Using a blood-count plate, the number of spleen cells prepared in (A) was counted, and the cells were diluted with RPMI 1640 medium so as to set the cell density to 1×10^7 cells/ml in terms of viable cells. This cell suspension was seeded in a 6-well flat-bottomed plate at 2.5 ml/well. Into this plate was added and mixed 250 µg/ml Nopia (a trade name, nonproprietary name: romurtide, a product of Daiichi Pharmaceutical Co.) at a rate of 100 µl/well, and the serially diluted uracil-KLH complex obtained in the aforesaid 1: (B) was then added and mixed at a rate of 100 µl/well, after which this plate was left standing still at 37°C for 15 minutes in a 5% CO₂ ambience.

The serial dilutions were conducted so as to obtain 2500 ng/ml, /33 500 ng/ml, 100 ng/ml, 20 ng/ml, and 4 ng/ml.

Thereafter, RPMI 1640 medium containing 40% fetal bovine serum (FBS) was added at a rate of 2.5 ml/well and mixed, and the cells were incubated at 37°C for 5 days in a 5% CO₂ ambience, thereby obtaining sensitized B cells (antibody-producing cells).

3: Cell Fusion

(A) Preparation of Myeloma Cells

As the myeloma, P3U1 cells were used, which were of the 8-dazaguanine [sic]-resistant mouse (BALB/C origin) myeloma cell line. The P3U1 cells were subcultured beforehand in RPMI 1640 medium containing 10% FBS every three days.

The P3U1 cells from the first day of the subculture was transferred to a 50 ml-capacity centrifuging tube and centrifuged at 1,000 rpm at 4°C for 5 minutes. The supernatant was eliminated, and the precipitated P3U1 cells were suspended in 10 ml of RPMI 1640 medium. The myeloma (P3U1 cells) thus prepared was used for the cell fusion.

(B) Preparation of Sensitized B Cells (Antibody-Producing Cells)

The spleen cells (antibody-producing cells) that were incubated for 5 days and immunized in the aforesaid 2: (B) were suspended with a pipette, and the spleen cells that were not adhering to the plate were pooled together into a 50 ml centrifuging tube. They were centrifuged /34 at 1,000 rpm at 4°C for 7 minutes. The supernatant was eliminated, and the precipitated cells were suspended in 10 ml of RPMI 1640 medium. The sensitized cell cluster thus prepared was used for the following cell fusion.

(C) Cell Fusion

The P3U1 cells prepared in (A) and the sensitized cell cluster prepared in (B) were counted and mixed at a rate of P3U1 cells (cell count) : sensitized cell cluster (cell count) = 1 : 5, and the mixture was left standing still at room temperature for 15 minutes. Thereafter, the mixture was centrifuged at 1,000 rpm at room temperature (for 7 minutes), and the supernatant was eliminated. The centrifuging tube was tapped to loosen the precipitated cells. While the centrifuging tube containing the loosened cells was rotated, 50% polyethylene glycol (average molecular weight: 1,000) was added to it at a rate of 1 ml per 2×10^8 total cells for 10 seconds, and the rotation was continued for 50 seconds more. While the centrifuging tube was still rotated, 15 ml of RPMI 1640 medium was added over the course of 3 minutes, and 25 mL of RPMI 1640 medium was further added over the course of 1 minute. The screw cap of the centrifuging tube was closed, and the centrifuging tube was turned upside down 2 to 3 times to make the content solution uniform, after which the content solution was centrifuged at 1,000 rpm at room temperature for 7 minutes. The supernatant was eliminated, and the precipitate was suspended (at 1.6

x 10⁶/ml in terms of the sensitized cells) in HAT medium containing 10% fetal calf serum. This cell suspension was distributed on a 96-well flat-bottomed plate at 200 to 250 µl/well. The plate was left standing at 37°C in a 5% CO₂ ambience to incubate for 12 days. /35

4: Screening of Hybridoma

The following procedure was carried out with the hybridoma cells obtained in 3.

(A) Screening by ELISA

The uracil-BSA complex having a concentration of 20 µg/ml (in terms of BSA) obtained in 1:(A) was placed in a 96-well immunoplate at a rate of 50 µl/well and left standing at 37°C for 2 hours. Thereafter, the plate was washed seven times with PBS (pH 7.3 - 7.7, a product of Nissui Pharmaceutical Co., hereinafter referred to as PBS-T) containing 0.05% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (a product of Wako Jun'yaku Kogyo Co., a Tween 20-equivalent product), after which 200 µl of 60% calf serum was added and left standing at 37°C for 2 hours.

Thereafter, the plate was washed with PBS-T seven times, and the following was added to the wells at a rate of 50 µl/well:

- (i) a solution obtained by mixing 30 µl of the hybridoma culture supernatant obtained in 3: and 3 µl PBS and by reacting them at 37°C for 1 hour,
 - (ii) a solution obtained by mixing 30 µl of the hybridoma culture supernatant and 30 µl of a solution of uracil dissolved at 1 mg/ml in PBS and subsequently reacting them at 37°C for 1 hour, or /36
 - (iii) 1 µg/ml normal mouse IgG (a product of Biological Co.),
- and the plate was left standing at 37°C for 1 hour. Subsequently, the wells were washed with PBS-T seven times, and alkaline phosphatase (AP)-labeled anti-mouse polyvalent immunoglobulin antibody (a product of Sigma Co.) that was diluted to 1:300 with 1% BSA was placed in the wells at 50 µl/well and left standing at 37°C for 1 hour. Thereafter, the wells were washed with PBS-T seven times, and a solution prepared by dissolving p-nitrophenyl disodium phosphate (a product of Wako Jun'yaku Kogyo Co.) in a substrate buffer at 1 mg/ml was placed in the wells at 100 µl/well and left standing at 37°C for 30 minutes. Thereafter, 2N NaOH was placed in the wells at 50 µl/well and mixed with a plate mixer, thereby terminating the reaction, and the absorbance at 415 nm was read with a microplate reader.

Absorptance was calculated with the following equation.
Absorptance (%) = $[1 - (\text{OD uracil} - \text{OD control}) / (\text{OD}_{\text{PBS}} - \text{OD control})] \times 100$

(i) OD_{PBS} : Absorbance in ELISA when the hybridoma culture supernatant was pretreated with PBS alone

(ii) OD uracil : Absorbance in ELISA when the hybridoma culture supernatant was pretreated with uracil /37

(iii) OD control : Absorbance in ELISA when the hybridoma culture supernatant was pretreated with normal mouse IgG alone

Hybridoma cells having high measurement sensitivity were selected by the aforesaid measurements.

(B) As a result of the aforesaid screening, 5 kinds of monoclonal antibody-producing cells (3C10, 1C4, 4E3, 3D5, and 1C5) were obtained. Of these, 4E3 was deposited pursuant to the Budapest Treaty as "Mouse hybridoma SU-1" with the National Institute of Bioscience and Human-Technology of the Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry [accession number: NIBHT No. 6141 (FERM BP-6141).]

5: Cloning

The monoclonal antibody-producing hybridoma cells thus obtained were cloned by known and conventional limiting dilution.

In particular, the number of the monoclonal antibody-producing hybridoma cells obtained in 4: was determined, and the cells were distributed at a rate of 0.8 cell/0.25 ml/well, using RPMI 1640 medium that contained 10% FBS and 10% BM condimed H1 (a trade name, a product of Boehringer Mannheim Co.) and incubated at a 5% CO₂ concentration at 37°C for 10 to 14 days. /38

The obtained clones were screened by ELISA that was conducted in the same manner as the method described in 4: (A). As a result, several monoclonal antibody-producing hybridoma cells were cloned as cells that could produce uracil-specific antibodies.

6: Preservation of the anti-uracil monoclonal antibody-producing hybridoma

The obtained hybridoma cells were prepared so as to have 1×10^7 cells/ml in RPMI 1640 medium containing 10% FBS and 10% DMSO and dispensed 1 ml per cryotube (a product of Nunc Co.) These cryotubes

were frozen in a -90°C deep freezer and subsequently stored in liquid nitrogen.

Working Example 2 Preparation of Monoclonal Antibody and Evaluation Thereof

The number of the monoclonal antibody-producing hybridoma cells "Mouse hybridoma SU-1" obtained in 4: of Working Example 1 was determined, and the cells were distributed at a rate of 0.8 cell/0.25 ml/well, using RPMI 1640 medium that contained 10% FBS and 10% BM condimed H1 (a product of Boehringer Co.) and incubated at a 5% CO₂ concentration at 37°C for 10 to 14 days.

Using the obtained hybridoma culture supernatant, the reactivity /39 of the monoclonal antibody SU-1 of the present invention was studied according to the indirect competitive inhibitory ELISA described in 4: (A) in Working Example 1.

Specifically speaking, the uracil-BSA complex (10 µg/ml) was dispensed in a 96-well immunoplate (Immunoplate I, a product of Nunc Co.) at 50 µl/well and left standing at 37°C for 2 hours, after which the plate was washed seven times in all with 200 µl/well of PBS-T that contained 0.1 % of Tween 20. Subsequently, as blocking, 200 µl/well of 3% BSA-containing PBS was added to the wells and left standing overnight at 4°C, after which the wells were washed with PBS-T three times, thus preparing a plate.

Meanwhile, the following was added at a rate of 50 µl/well to the aforesaid 96-well plate to which an antigen was adsorbed:

(i) 30 µl of the hybridoma culture supernatant to which 30 µl PBS was added, (ii) a solution obtained by adding 30 µl PBS that contained uracil (30 - 1000 µg/ml) to 30 µl of the hybridoma culture supernatant and leaving the mixture at 37°C for 1 hour, or (iii) 1 µl/ml normal mouse IgG (a product of Biological Co.), and the plate was left standing at 37°C for 1 hour. Next, this plate was washed with PBS-T /40 seven times, and alkaline phosphatase-labeled anti-mouse antibody (a secondary antibody, a product of Sigma Co.) that was diluted to 1:1000 with 1% BSA-containing PBS was added at a rate of 50 µl/well and left standing at 37°C for 1 hour. Thereafter, the plate was washed with PBS-T seven times, and 100 µl/well of an enzyme substrate solution (1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate, pH 9.8) was added and left standing at 37°C for 30 minutes. Subsequently, 50 µl/well of 2N NaOH was added to terminate the reaction, and the absorbance at 415 nm was read with a plate reader.

Absorptance was found by the aforesaid equation.

The results are shown in Fig. 1. As seen from the figure, the quantity of uracil can be measured in the range of 100 to 1,000 µg/ml.

Working Example 3 Cross-reactivity test

In the same manner as in Working Example 2, the reactivities of other uracil-based compounds and the monoclonal antibody (SU-1) of the present invention were studied. In particular, using pseudouridine, dihydrouracil, thymine, and cytosine (1 mg/ml) individually in the place of uracil (1 mg/ml) in step (ii) of Working Example 2, which was implemented to examine the inhibition against uracil, experiments were conducted in a similar manner, thereby studying the reactivities of the uracil-based compounds and the monoclonal antibody (SU-1) of the present invention. The results are shown in Table 1.

<Table 1>

/41

CROSS REACTIVITY TO URACIL-BASED COMPOUNDS	
Uracil-Based Compounds	Monoclonal Antibody SU-1*
Uracil	100
Pseudouridine	-15
Dihydrouracil	-19
Thymine	46
Cytosine	-28

* Indicates a relative value of the absorptance of each uracil-based compound having a concentration of 1 mg/ml when the absorptance of uracil is assumed to be 100%

As is evident from the results, the monoclonal antibody of the present invention reacted specifically to uracil and exhibited no reactivity at all to pseudouridine and dihydrouracil.

Working Example 4 Use of a uracil derivative-schlepper complex as the immunogen - 1

1: Preparation of Immunogen (1-carboxymethyl uracil-schlepper complex)

As in Working Example 1, using the Immject Immunogen EDC Conjugation Kit (a product of Pierce Co.), bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH) was coupled with 1-carboxymethyl uracil according to the attached manual, thereby preparing a 1-carboxymethyl uracil-BSA complex or 1-carboxymethyl uracil-KLH complex. More specifically, the following method was used for the preparation.

- 1) 1-carboxymethyl uracil (6 mg) was dissolved in 1.5 ml of a conjugation buffer [0.1 M MES (2-(N-Morpholio)-ethane sulfonic acid), 0.15 M NaCl, pH 4.7.]
- 2) BSA or KLH (10 mg) was dissolved in 1 ml of the conjugation buffer.
- 3) To 200 μ l of the BSA or KLH solution prepared in 2) was added 50 μ l of the 1-carboxymethyl uracil solution prepared in 1) and 125 μ l of 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide (EDC) (50 μ l for KLH).
- 4) After the solution obtained in 3) was left standing at 37°C for 2 hours, it was centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes, and the precipitate was eliminated.
- 5) The solution obtained in 4) was passed through a gel-filtration column (Sephadex G25), thereby eliminating the unchanged 1-carboxymethyl uracil and low-molecular substances. /43
- 6) The solution obtained in (5) was added to a D-salt dextran desalting column, and the eluate was fractionated at 0.5 ml/tube. The absorbance of each fraction at 280 nm and 260 nm was measured, and the first-peak fractions were pooled and used as the 1-carboxymethyl uracil-BSA (or KLH) complex solution.
- 7) The confirmation of the complex was carried out by analyzing the OD 270 nm absorbance derived from the pyrimidine skeletal structure of 1-carboxymethyl uracil. As a result, it was estimated that one molecule of BSA or KLH was coupled with 4.98 or 22.9 molecules of 1-carboxymethyl uracil, respectively.

2: Preparation of Immune cells (antibody-producing cells) by In Vitro Immunization

(A) Preparation of Spleen Cells

According to the method described in 2: in Working Example 1, spleens were aseptically extracted from BALB/c mice, and spleen cells were isolated and prepared into a cell density of 1×10^7 cells/ml (RPMI 1640 medium that did not contain serum, a product of Nissui Pharmaceutical Co.), and this cell suspension was seeded in a 6-well flat-bottomed plate at 2.5 ml/well. Into this plate were added 100 μ l (250 μ g/ml) MDP diluted with RPMI 1640 medium so as to set the final concentration to 25 μ g/well and a 1-carboxymethyl uracil-BSA complex /44 (serial dilution end concentration: 20 ng/ml, 100 ng/ml, and 500 ng/ml). This plate was left standing still at 37°C for 15 minutes in a 5% CO₂ ambience. Thereafter, RPMI 1640 medium containing 40% fetal

bovine serum (FBS) was added at a rate of 2.5 ml/well and mixed, and the cells were incubated at 37°C for 4 to 5 days in a 5% CO₂ ambience, thereby obtaining sensitized B cells (antibody-producing cells).

3: Cell Fusion

As the myeloma used for cell fusion, P3U1 cells were used, as in Working Example 1, and, as the sensitized B cells (antibody-producing cells), a sensitized cell cluster that was obtained by further processing the aforesaid sensitized B cells according to 3: in Working Example 1 was used.

As in Working Example 1, the cell fusion was carried out using the polyethylene glycol method. In particular, P3U1 cells and the sensitized cell cluster were mixed so as to set their cell counts to a 1 : 5 ratio, to which mixture was added 50 % polyethylene glycol (average molecular weight: 1,000) and stirred gently. Thereafter, the mixture was dispersed on RPMI 1640 medium and centrifuged (1,000 rpm, room temperature, 7 minutes), thereby precipitating the cells, and the supernatant was eliminated. The precipitate was diluted with 10% FBS-containing HAT medium (1.6 x 10⁶ cells/ml in terms of the sensitized /45 cells), and this cell suspension was seeded in a 96-well flat-bottomed plate at a rate of 250 µl/well and incubated at 37°C in a 5% CO₂ ambience by stationary culture.

4: Screening of Hybridoma

In HAT medium, which was used for the aforesaid stationary culture, only hybridomas that have achieved cell fusion grow and form colonies. Utilizing this fact, the hybridoma cells obtained after 10 to 14 days of the aforesaid stationary culture were screened with the ELISA using an immunogen to find whether antibodies having the target characteristics were produced in the culture supernatant or not.

(A) Screening by ELISA

The 1-carboxymethyl uracil-BSA complex having a concentration of 10 µg/ml (in terms of BSA) obtained in 1: was placed in a 96-well immunoplate at a rate of 50 µl/well and left standing at 37°C for 2 hours. Thereafter, the plate was washed seven times with PBS (a product of Nissui Pharmaceutical Co., PBS-T) containing 0.1% Tween 20, after which, as blocking, 3% BSA-containing PBS was added at a rate of 200 µl/well and left standing at 4°C overnight. Thereafter, the plate was washed with PBS-T three times, thereby preparing an antigen-adsorbed plate.

Meanwhile, the following was added at a rate of 50 μ l/well to the antigen-adsorbed 96-well plate that was prepared in the foregoing:
(i) the solution obtained by adding 30 μ l PBS to 30 μ l of the hybridoma culture supernatant and by leaving the mixture at 37°C for 1 hour, (ii) a solution obtained by adding 30 μ l PBS that contained /46 uracil (1 mg/ml) to 30 μ l of the hybridoma culture supernatant and leaving the mixture at 37°C for 1 hour, or (iii) 1 μ g/ml normal mouse IgG (a product of Biological Co.), and the plate was left standing at 37°C for 1 hour. Next, these wells were washed with PBS-T seven times, and alkaline phosphatase (AP)-labeled anti-mouse polyhydric immunoglobulin antibody (a product of Sigma Co.) that was diluted to 1:1000 with 1% BSA-containing PBS was added at a rate of 50 μ l/well and left standing at 37°C for 1 hour. Thereafter, the plate was washed with PBS-T seven times, and a solution of p-nitrophenyl disodium phosphate (a product of Wako Jun'yaku Kogyo Co.) dissolved in a substrate buffer (pH 9.8) so as to set the concentration to 1 mg/ml was placed at 100 μ l/well and left standing at 37°C for 30 minutes. Subsequently, 50 μ l/well of 2N NaOH was added and mixed with a plate mixer to terminate the reaction, and the absorbance at 415 nm was read with a plate reader.

Absorptance was found according to the method in Working Example 1.

As a result of the aforesaid screening, three kinds of monoclonal antibody-producing cells (3H5, 5C9, and 5D10) were obtained.

5: Cloning

/47

The monoclonal antibody-producing hybridoma cells thus obtained were cloned by known and conventional limiting dilution.

In particular, the number of the monoclonal antibody-producing hybridoma cells obtained in 4: was determined, and the cells were distributed at a rate of 0.8 cell/0.25 ml/well, using RPMI 1640 medium that contained 10% FBS and 10% BM condimed H1 (a trade name, a product of Boehringer Mannheim Co.) and incubated at a 5% CO₂ concentration at 37°C for 10 to 14 days.

The obtained clones were screened by ELISA that was the same as the method described in 4:. As a result, several monoclonal antibody-producing hybridomas were cloned as cells that could produce uracil-specific antibodies.

Working Example 5 Use of a uracil derivative-schlepper complex as the immunogen - 2

1: Preparation of Immunogen (uridine dialdehyde-schlepper complex)

As in Working Example 1, using the Immject Immunogen EDC Conjugation Kit (a product of Pierce Co.), bovine serum albumin (BSA) was coupled with uridine dialdehyde according to the attached manual, /48 thereby preparing an uridine dialdehyde-BSA complex. More specifically, the following method was used for the preparation.

- 1) BAS (200 μ g) was dissolved in 0.5 ml of a 0.3 M NaHCO_3 buffer solution (pH 8.4).
- 2) 2 mg uridine dialdehyde was dissolved in 0.5 ml of a 0.3 M NaHCO_3 buffer solution (pH 8.4), and 107 μ l of the solution was added to the BSA solution prepared in the aforesaid 1).
- 3) The solution prepared in 2) was stirred at 4°C overnight.
- 4) To this solution was added NaBH_4 in a quantity of 1.5 equivalent weight (2.66 μ mol) of uridine dialdehyde, and the mixture was left on ice for 3 hours.
- 5) Subsequently, NaBH_4 in a quantity of 1.5 equivalent weight (2.66 μ mol) of uridine dialdehyde was further added and stirred again at 4°C overnight.
- 6) Using acetic acid, the solution was adjusted to pH 4.5 and was passed through a gel filtration column (Sephadex G25), thereby eliminating unchanged uridine dialdehyde and low-molecular substances.
- 7) The solution obtained in (6) was added to a D-salt dextran desalting column, and the eluate was fractionated at 0.5 ml/tube. The absorbance of each fraction at 280 nm and 260 nm was measured, and /49 the first-peak fractions were pooled and used as the uridine dialdehyde-BSA complex solution.
- 8) The confirmation of the complex was carried out by analyzing the OD 260 nm absorbance derived from the pyrimidine skeletal structure of uridine dialdehyde. As a result, it was estimated that one molecule of BSA was coupled with 27.8 molecules of uridine dialdehyde.

Like the one in Working Example 4, this complex can also be used for obtaining the hybridoma and monoclonal antibody.

Working Example 6 Use of a uracil derivative-schlepper complex as the immunogen - 3

1: Preparation of Immunogen (5-bromo-1-carboxymethyl uracil-schlepper complex)

As in Working Example 1, using the Immject Immunogen EDC Conjugation Kit (a product of Pierce Co.), bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH) was coupled with 5-bromo-1-carboxymethyl uracil according to the attached manual, thereby preparing a 5-bromo-1-carboxymethyl uracil-BSA (or KLH) complex. More specifically, the following method was used for the preparation.

1) 5-bromo-1-carboxymethyl uracil (4 mg) was dissolved in 1 ml of a /50 conjugation buffer [0.1 M MES (2-(N-Morpholio)-ethane sulfonic acid), 0.9 M NaCl, 0.02% NaN₃, pH 4.7.]

2) BSA (or KLH) (10 mg) was dissolved in 1 ml of the conjugation buffer.

3) To 200 µl of the BSA (or KLH) solution prepared in 2) were added 50 µl of the 5-bromo-1-carboxymethyl uracil solution prepared in 1) and 125 µl (50 µl for KLH) of 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide (EDC).

4) After the solution obtained in 3) was left standing at 37°C for 2 hours, it was centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes, and the precipitate was eliminated.

5) The solution obtained in (4) was added to a D-salt dextran desalting column, and the eluate was fractionated at 0.5 ml/tube. The absorbance of each fraction at 280 nm and 260 nm was measured, and the first-peak fractions were pooled and used as the 5-bromo-1-carboxymethyl uracil-BSA (or KLH) complex solution.

6) The confirmation of the complex was carried out by analyzing the OD 280 nm absorbance derived from the pyrimidine skeletal structure of /51 5-bromo-1-carboxymethyl uracil. As a result, it was estimated that, with regard to the 5-bromo-1-carboxymethyl uracil-BSA complex, 7.31 molecules of uridine aldehyde [sic] were coupled with one molecule of BSA.

Like the one in Working Example 4, this complex can also be used for obtaining the hybridoma and monoclonal antibody.

Applicability to Industrial Use

The monoclonal antibody of the present invention reacts specifically to uracil and thus can measure uracil in samples easily, quickly, and selectively. Furthermore, since this monoclonal antibody shows no reactivity at all to pseudouridine and dihydrouracil, it is useful in screening DPD-deficient individuals by testing human urine samples, and it is especially useful for screening DPD-deficient patients to whom fluoropyrimidine-based anticancer agents are contraindicated.

The present invention provides a method for selecting a safe treatment in anticancer-drug therapy for cancer patients and a tool used for it.

Claims

/52

1. A hybridoma that is obtained by the cell fusion of myeloma and an animal-origin antibody-producing cell that is prepared by using, as the immunogen, a conjugate of uracil or derivative thereof and a schlepper, said hybridoma having a characteristic of producing a monoclonal antibody that reacts specifically with uracil.
2. The hybridoma stated in Claim 1, wherein the aforesaid monoclonal antibody has a characteristic of reacting with uracil but not reacting with pseudouridine and dihydrouracil.
3. The hybridoma stated in Claim 1 or 2, wherein the antibody-producing cells are prepared by bringing animal-origin spleen cells into contact in vitro with a conjugate of uracil or its derivative and of a schlepper to immunize them.
4. The hybridoma stated in one of Claims 1 through 3, wherein the antibody-producing cells are obtained from mouse spleen cells.

5. The hybridoma stated in one of Claims 1 through 4, wherein the uracil or its derivative that couples with a schlepper is a minimum of one kind selected from a group consisting of uracil, uracil derivatives having a carboxymethyl group, uracil derivatives having a carboxyl group, uridine dialdehyde, uridine 5'-phosphate, polyuridic acid, N-carbamyl- β -alanine, orotidine 5'-phosphate, and uridine 5'-diphosphoglucuronate.

/53

6. The hybridoma stated in Claim 5, wherein the uracil or its derivative that couples with a schlepper is a minimum of one kind selected from a group consisting of uracil, uracil derivatives having

a carboxymethyl group, uracil derivatives having a carboxyl group, uridine dialdehyde, and uridine 5'-phosphate.

7. The hybridoma stated in Claim 5, wherein the uracil or its derivative that couples with a schlepper is a minimum of one kind selected from a group consisting of uracil, uracil derivatives having a carboxymethyl group, and uridine dialdehyde.

8. The hybridoma stated in one of Claims 1 through 7, wherein the schlepper is keyhole limpet hemocyanin or bovine serum albumin. /54

9. The hybridoma stated in Claim 8, wherein the conjugate of uracil or its derivative and a schlepper, which is used as the immunogen, is a minimum of one kind selected from a group consisting of a uracil-hemocyanin complex, uracil-bovine serum albumin complex, 1-carboxymethyl uracil-hemocyanin complex, 1-carboxymethyl uracil-bovine serum albumin complex, 5-bromo-1-carboxymethyl uracil-hemocyanin complex, 5-bromo-1-carboxymethyl uracil-bovine serum albumin complex, uridine dialdehyde-hemocyanin complex, and uridine dialdehyde-bovine serum albumin complex.

10. The hybridoma stated in one of Claims 1 through 9, wherein the myeloma is a myeloma cell line obtained from mice.

11. A hybridoma whose accession number is FERM BP-6141.

12. A monoclonal antibody that is produced by the aforesaid hybridoma described in one of Claims 1 through 11 and that reacts specifically with uracil. /55

13. The monoclonal antibody stated in Claim 12 that is produced by the aforesaid hybridoma described in one of Claims 1 through 11 and that reacts with uracil but does not react with pseudouridine or dihydrouracil.

14. A uracil immunochemical assay that is characterized by detecting or quantifying uracil in specimens using the monoclonal antibody described in Claim 12 or 13.

15. A uracil immunochemical assay for detecting or quantifying uracil in specimens, said method being characterized by bringing the monoclonal antibody stated in Claim 12 or 13 into contact with the specimens and by using either a radioimmunoassay, enzyme immunoassay, fluorescent antibody technique, or agglutination reaction method.

16. The uracil immunochemical assay stated in Claim 14 or 15 that contains the following process steps:

(a) a step of blending a specimen suspected of containing uracil with the monoclonal antibody stated in Claim 12 or 13 in a reaction system /56 that contains an antigen-immobilized product comprised of a conjugate of uracil or its derivative and of a schlepper,

(b) a step of incubating the aforesaid reaction product under conditions in which an antigen-antibody complex is formed,

(c) a step of reacting a secondary antibody with the immobilized antigen-antibody complex, and

(d) a step of detecting the immobilized antigen-antibody complex that has coupled with the secondary antibody.

17. The uracil immunochemical assay stated in one of Claims 14 through 16, wherein the specimens are urine samples.

/1/1

[FIG. 1]

